

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Doctorado en Psicología

Facultad de Psicología

Diana Verónica Castillo Padilla

Título:

Plasticidad Homeostática: Mecanismos asociados a las acciones del Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF) sobre el Condicionamiento Aversivo a los Sabores (CAS).



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mis abuelos que son los orígenes de mi historia. Por sus enseñanzas para forjar un futuro con los mejores momentos del pasado. Y al futuro.

Agradecimientos

Gracias a mis padres Dalia y Maximiliano por apoyarme, amarme y estar conmigo en todo momento.

Gracias a mi hermano y amigo Goyo, por ayudarme y por compartir una vida conmigo, a mi hermana Yadira por su compañía, a un futuro hombre, Edwin por enseñarme cosas que ya había olvidado del ser humano.

Gracias a mi familia, a la familia Castillo por estar conmigo en mis primeras etapas, a la familia Padilla por ayudarme a terminar este ciclo.

Gracias a la Dra. Martha L. Escobar Rodríguez por todo tu apoyo y por todas tus enseñanzas, con todo mi respeto, cariño y admiración.

Gracias a mis tutores la Dra. Feggy Ostrosky y el Dr. Roberto Prado, por todas las sugerencias y observaciones que realizaron al proyecto.

Gracias a todas las personas que me han acompañado, a los que se fueron, a los que se quedan y a aquéllos que inician una historia conmigo.

Gracias a mi Universidad por permitirme realizar otro sueño.

INDICE

1.	Introducción.....	5
2.	Antecedentes.....	7
2.1.	Neurociencia cognitiva: aprendizaje y memoria.....	7
2.2.	Potenciación a largo plazo.....	13
2.2.1.	Características generales.....	13
2.2.2.	Mecanismos moleculares de la LTP.....	14
2.2.3.	LTP y conducta.....	18
2.3.	Plasticidad homeostática.....	19
2.3.1.	Metaplasticidad.....	19
2.4.	Los factores neurotróficos y el sistema nervioso.....	22
2.4.1.	Factor neurotrófico derivado del cerebro.....	23
2.4.2.	El BDNF en la plasticidad sináptica.....	24
2.5.	Condicionamiento aversivo a los sabores.....	26
2.5.1.	Corteza insular: sustrato anatómico del CAS.....	28
2.5.2.	La amígdala y el CAS.....	30
2.6.	BDNF, LTP y corteza insular	32
3.	Planteamiento del problema y justificación.....	33
4.	Objetivos generales.....	34
5.	Objetivos particulares.....	34
6.	Procedimiento experimental.....	35
7.	Resultados	43
8.	Discusión.....	62
9.	Implicaciones y Conclusión.....	74
10.	Referencia.....	75

Resumen

Los mecanismos celulares que subyacen el almacenamiento de información en el sistema nervioso no han sido del todo esclarecidos, sin embargo, se ha observado la participación de algunas moléculas. Una de estas moléculas es el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). Estudios recientes muestran la participación del BDNF en los cambios plásticos a largo plazo en el sistema nervioso adulto relacionados con el aprendizaje y la memoria. La potenciación de largo plazo (LTP) es un modelo celular relacionado con los cambios que subyacen al aprendizaje y la memoria, traducido al incremento prolongado de la eficacia sináptica, debido a la estimulación de las aferencias a un área determinada del sistema nervioso, descrito inicialmente por Bliss y Lomo en 1973. Investigaciones recientes han demostrado que el BDNF juega un papel importante para la inducción y mantenimiento de la LTP. La LTP, inicialmente observada en el hipocampo, ha sido subsecuentemente observada en diversas regiones cerebrales, entre las que se encuentra la neocorteza, tal es el caso de la corteza insular (CI). La CI es un área relacionada con el almacenamiento de tareas aversivas, como el condicionamiento aversivo a los sabores (CAS). La CI tiene importantes conexiones con el núcleo basolateral amigdalino (Bla), lo que influye en su relación con el aprendizaje de tareas aversivas. Recientes investigaciones demuestran que la inducción de LTP en la proyección (Bla-CI) previa al entrenamiento en el CAS, aumenta la retención de esta tarea, así como que el BDNF es capaz de inducir por sí solo un fenómeno similar a la LTP en la corteza insular, en ausencia de estimulación de alta frecuencia (Escobar et al., 2003). Así, el primer objetivo del presente estudio fue observar los efectos que ejerce el BDNF infundido en la CI sobre el condicionamiento aversivo a los sabores, así como analizar a través de qué mecanismos lleva a cabo sus acciones. Para la presente investigación se utilizaron ratas adultas de la cepa Wistar con pesos de 350-380g a las que se les microinfundió BDNF o los correspondientes inhibidores de proteínas cinasas o sustancias control. La división experimental de los sujetos fue la siguiente: Grupo PBS al que se administró amortiguador de fosfatos como vehículo; grupo BDNF, al que se administró la neurotrofina; grupo CYT-C al que se administró citocromo C, como control proteico; grupo (BDNF+K252a), al que se administró una combinación de BDNF con un inhibidor de los receptores Trk; y grupo control CON que permaneció intacto. Con el fin de analizar los mecanismos celulares implicados en las acciones del BDNF, los grupos experimentales empleados fueron los siguientes: grupo LY294002+BDNF, al que se administró el inhibidor para la proteína cinasa PI3K (fosfatidilinositol 3 cinasa) seguido de la administración de BDNF; grupos PD98059+BDNF y U0126+BDNF, a los que se administraron inhibidores para MAPK (proteínas cinasas activadas por mitógenos) seguidos de la administración de BDNF, y finalmente grupo control que permaneció intacto sin administración de ningún fármaco y sin implantación de cánulas. Los resultados derivados de estos experimentos mostraron que la administración intracortical aguda de BDNF (en concentraciones capaces de inducir LTP en ausencia de estimulación

tetánica) en la corteza insular de ratas adultas, incrementa la retención del CAS, y sus efectos son debidos a la activación de las cascadas de señalización MAPK y PI3K. Estos resultados sugieren la participación del BDNF en los mecanismos que subyacen el aprendizaje y la memoria en la corteza insular. El segundo objetivo de la presente investigación consistió en analizar la influencia del entrenamiento en el CAS sobre la subsecuente inducción de LTP en la vía que va del núcleo basolateral amigdalino a la corteza insular en ratas adultas *in vivo*. Asimismo, analizar las diferentes ventanas temporales entre el CAS y la LTP con el fin de estudiar la permanencia del fenómeno. Para abordar el segundo objetivo se utilizaron también ratas adultas de la cepa Wistar con pesos entre 350-380g. Estas fueron divididas en los siguientes grupos experimentales: grupos CAS+LTP, los cuales fueron entrenados en el CAS 48, 72, 96 y 120 hrs previas a la fase electrofisiológica, grupos pseudoCAS+LTP que fueron entrenados 48, 72, 96 y 120 hrs antes de la fase electrofisiológica, pero en ausencia del estímulo aversivo, por lo que en sustitución de LiCl se les administró PBS y por último el grupo LTP que se sometió directamente a los registros electrofisiológicos. Los resultados demuestran que el CAS previene la subsecuente inducción de plasticidad sináptica en la vía BLA-CI, y que el efecto producido por el CAS sobre la LTP en la CI se mantiene al menos por 120 horas. Estos resultados muestran que el CAS produce un efecto metaplástico (entendido como un cambio en la habilidad para inducir subsecuente plasticidad sináptica) sobre la LTP y que es persistente en el tiempo, apoyando de esta forma la visión actual de que los mecanismos responsables de los cambios plásticos dependientes de la conducta son similares a los encargados de producir LTP. Los resultados derivados de nuestras investigaciones muestran la convergencia entre los patrones de señalización activados durante los incrementos de la eficacia sináptica y los procesos de aprendizaje y memoria, coadyuvando a la comprensión de los mecanismos celulares que subyacen al proceso de almacenamiento de información.

Introducción

Derivada de la convergencia entre la psicología cognitiva y la neurobiología surge la neurociencia cognitiva entre cuyos múltiples objetivos, se encuentra el dilucidar los mecanismos que subyacen al procesamiento y almacenamiento de información en el sistema nervioso (Kandel et al., 1992). Se considera al aprendizaje como la adquisición de nueva información o conocimiento y a la memoria como la retención de la información aprendida (Bear et al., 2001, Kandel et al., 2001). El aprendizaje y la memoria son propiedades del sistema nervioso que nos permiten adquirir, retener y evocar diferentes tipos de información (Bear et al., 2001). En el contexto de la neurociencia cognitiva existen investigaciones encaminadas a responder dos preguntas fundamentales, dónde se almacena la información y cómo hace el sistema nervioso para almacenar dicha información. En 1984 Ramón y Cajal propuso que la memoria podría almacenarse a través de cambios anatómicos producidos por modificaciones de la fortaleza en la transmisión sináptica; más tarde Donald Hebb propuso que las conexiones sinápticas pueden fortalecerse cuando las neuronas presinápticas y postsinápticas son activadas simultáneamente (citado por Kandel, 2001). Un modelo celular ampliamente relacionado con los procesos que subyacen a la retención de información en el cerebro por tiempo prolongado, es la potenciación a largo plazo. Investigaciones han demostrado que el BDNF juega un papel importante para la inducción y mantenimiento de la LTP (Ying et al., 2002; Escobar et al., 2003; Mulholland et al., 2007; Rex et al., 2007; Wibrand et al., 2007). La LTP ha sido observada en varias regiones del sistema nervioso, entre las que se encuentra la neocorteza (Ying et al., 2002; Hardingham et al., 2003; Connor et al., 2006; Toyoda; 2007) un ejemplo es la corteza insular (Escobar et al., 1998). La corteza insular es un área involucrada con la adquisición y almacenamiento tareas aversivas como el condicionamiento aversivo a los sabores (CAS), un paradigma ampliamente utilizado por sus implicaciones de sobrevivencia y

adaptación de las especies. La corteza insular tiene importantes conexiones con la amígdala, específicamente con el núcleo basolateral lo que influye en su relación con el aprendizaje de tareas aversivas. Escobar y colaboradores (2003) observaron que la infusión de BDNF en la corteza insular induce un fenómeno similar a la LTP, en ausencia de estimulación de alta frecuencia. Asimismo nuestras investigaciones recientes derivadas de nuestro primer objetivo demuestran que la infusión aguda de BDNF (en concentraciones capaces de inducir LTP en ausencia de estimulación eléctrica) en la corteza insular, aumenta la retención de la tarea del CAS. Así en continuación de nuestro primer objetivo, con el fin de analizar los mecanismos por los cuales el BDNF lleva a cabo sus efectos sobre el CAS, utilizamos inhibidores para dos cascadas metabólicas involucradas en los mecanismos del aprendizaje y la memoria, para las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y para la proteína fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3K). Se ha demostrado que la inducción de LTP en la proyección amígdala basolateral-corteza insular (BLa-CI) previa al entrenamiento en el CAS (Escobar, 1998), incrementa significativamente la retención de esta tarea, por lo que, nuestro segundo objetivo en el presente estudio fue analizar los efectos del entrenamiento del CAS sobre la subsecuente inducción de LTP.

Antecedentes

Neurociencia cognitiva: aprendizaje y memoria

El aprendizaje y la memoria, son dos procesos psicológicos que han llamado la atención a lo largo de la historia. Aristóteles afirmaba que la memoria era la capacidad más importante del alma. Hume por su parte en su "*tratado de la naturaleza humana*", se refiere a la memoria como la causa primera que nos lleva a creer en la idea de la identidad personal. Esta idea es retomada por Kandel (1992) en "*The biological basis of learning and individuality*" (Las bases biológicas del aprendizaje y la individualidad), donde define al aprendizaje como el vehículo que nos lleva de la individualidad a la transmisión cultural, de generación en generación. Sin memoria no tendríamos recuerdo de quiénes somos, lo que somos y lo que hacemos, sin ir más allá, no podríamos sobrevivir ante un medio ambiente adverso. El aprendizaje, se refiere a la adquisición de información, obtenida del medio. Mientras que la memoria, se define como el almacenamiento de dicha información. Existen varias definiciones de memoria en neuropsicología, pero tal vez la característica más importantes es que la memoria es considerada como un sistema cognitivo, no unitario (Tulving, 1972).

En un inicio el estudio de la memoria tuvo una fuerte tendencia filosófica, por lo que el estudio experimental de la memoria se dificultó por muchos años, y no fue sino hasta 1885, que el filósofo Hermann Ebbinghaus en *Uber das Gedachtnis* (Sobre la memoria) presentó datos cuantitativos de la memoria humana. Ebbinghaus utilizó listas de sílabas sin sentido, las cuales eran leídas y memorizadas por sujetos normales, su objetivo fue observar cuantas sílabas recordaban en cierto lapso de tiempo y qué tan rápido las olvidaban, esto dio como resultado la curva de aprendizaje y olvido. Los hallazgos de Ebbinghaus, no sólo abrieron el panorama para el estudio de la memoria humana de forma experimental, así como para la psicología cognoscitiva, sino que también permitieron modelar un concepto de memoria que separó a la psicología de la filosofía. Años un poco más tarde, los estudios de Ebbinghaus dieron pie a nuevos

estudios, tal es el caso de los experimentos realizados por Müller y Pilzecker (1900), quienes descubrieron un fenómeno conocido como interferencia retroactiva. En sus experimentos, los sujetos estudiaron seis pares de sílabas (lista A) y luego estudiaron una segunda lista (lista X). Los resultados mostraron que la retención de la lista A se deterioró 1.5 horas después, por lo que se preguntaron ¿por qué la lista X habría de provocar un deterioro en el recuerdo posterior de la lista A cuando el aprendizaje tuvo lugar inmediatamente después de la lista A pero no cuando ocurrió seis minutos después de ella? Müller y Pilzecker (1900) contestaron que este fenómeno sucedía porque los procesos fisiológicos asociados con el aprendizaje de una lista perseveran por un periodo posterior al aprendizaje, y que esta perseverancia sirve para consolidar la huella de la memoria.

Más tarde, surgieron nuevos modelos para explicar la memoria, desde el psicoanálisis, hasta la psicología cognoscitiva. Freud como el máximo exponente del psicoanálisis dejó en su "Tratado de Psicología para Neurólogos" una propuesta del almacenamiento de memorias emocionales, intentando darle un respaldo anatómico a la memoria, cabe mencionar que anteriormente Hering (1870) en la conferencia "La memoria como función universal de la materia organizada" expuesta en el año 1870 en Viena, señaló dos puntos cruciales: 1) la memoria es una función de la sustancia cerebral y 2) las características de un organismo pueden transmitirse a su prole sin que el organismo las herede, sino que son adquiridas debido a las circunstancias especiales en las que vive, esto representa un producto de la memoria inconsciente...", la perspectiva de Hering influyó a pensadores como Ribot y Freud en sus tesis tiempo después.

La psicología cognoscitiva por su parte, aportó un modelo multialmacén. Atkinson y Shiffrin (1968), pioneros de la psicología cognoscitiva, propusieron un sistema que controla el flujo de información, esta información de acuerdo a estos autores podía ser almacenada en corto o en largo plazo, dependiendo de las estrategias para su codificación, operaciones de repaso o sus estrategias de

búsqueda. Sin embargo, lo más sobresaliente de su modelo, fue el argumento de que la memoria a corto plazo era esencial para la entrada y recuperación de la memoria a largo plazo, es decir, un almacenamiento temporal limitado, que era necesario para el almacenamiento temporal "ilimitado" de largo plazo.

Después de que la psicología cognoscitiva aportara una nueva clasificación de la memoria, emergió el apoyo de evidencias fisiológicas y anatómicas de estudios clínicos en pacientes amnésicos, que mostraban una memoria a corto plazo intacta, pero la memoria de largo plazo se veía deteriorada, o viceversa (Mayes, 1983; Milner, 1957). La memoria a corto plazo se distinguió por tener una capacidad limitada. Se propuso que el olvido en este tipo de memoria, puede suceder por tres mecanismos: desvanecimiento, interferencia ó desplazamiento, este último, se refiere a que los elementos son "empujados" hacia fuera, por los que lleguen después. Sin embargo, es probable que dichos mecanismos no sean excluyentes entre sí (Baddeley, 1983).

La memoria a largo plazo, es el último compartimiento del almacén de la memoria, es un sistema de capacidad ilimitada. Se ha propuesto que la capacidad limitada de la recuperación en la memoria a largo plazo es un factor de olvido, y no tanto la capacidad de almacenar; de este modo la información puede estar disponible pero no accesible (Tulving y Pearlstone, 1966). La memoria declarativa, explícita ó relacional respalda la capacidad de recolectar hechos y eventos, y se subdivide en: memoria episódica y semántica (Tulving, 1972). La memoria semántica, se encarga de almacenar nuestros conocimientos generales del mundo; mientras que la memoria episódica almacena los recuerdos de experiencias personales y de relaciones personales (Tulving, 1972). La memoria declarativa, puede contrastarse con el otro tipo de memoria llamada procedimental ó implícita, que comprende un conjunto de habilidades de memoria no declarativa, e incluye: habilidades y hábitos motores, formas simples de condicionamiento y el fenómeno de *priming*. En los 70's los investigadores ya tenían establecidas tres facetas del proceso

de la memoria: codificación, almacenamiento y recuperación, y otras divisiones por modalidad y contenido de la memoria (Baddeley, 1983).

Por su modalidad, la memoria se dividió en: Memoria sensorial, es la primera fase de almacenamiento, sin contenido simbólico o semántico de la información y forma parte integral de la percepción. Memoria icónica, se descubrió al mostrar imágenes instantáneas, los sujetos mostraron una capacidad de memoria muy limitada (segundos), lo que sugiere que la información del estímulo visual es registrado, pero no tarda en desvanecerse. Memoria ecoica, esta modalidad de almacenamiento registra el componente temporal de la información, a diferencia de la icónica que se especializa en las propiedades espaciales, esta distinción ha causado confusiones, debido a que su definición es muy similar a la de la memoria a corto plazo. Memoria motora, táctil y olfativa, este tipo de memorias forman parte de las memorias sensoriales, que son retenidas por muy poco tiempo. La memoria motora, se caracterizan por ser rápidamente almacenadas y fácilmente olvidadas (totalmente relacionada con la memoria de procedimiento).

Los estudios clínicos y anatómicos apoyaron la clasificación de la memoria. Un estudio que significó un gran avance para el estudio de la neuropsicología del aprendizaje y la memoria, fue el caso H.M. de Brenda Milner que fue publicado en 1957. Brenda Milner observó a este paciente, después de habersele realizado una ablación del lóbulo temporal, y descubrió a través de varias pruebas neuropsicológicas una incapacidad de H.M. para formar nuevas memorias, el paciente parecía no poder almacenar nuevos recuerdos. En un inicio se pensó que este déficit se generalizaba a todos los tipos de memorias, pero Milner observó en H.M. un tipo de memoria que no estaba afectada. La memoria de procedimiento en H.M. permanecía intacta. Se le pidió al paciente que dibujara una estrella a través de un espejo, la ejecución de esta tarea mejoraba a lo largo del tiempo, sin embargo H.M. no recordaba haber realizado dicha tarea. Cuando Brenda Milner pudo documentar de manera sistemática los efectos profundos de la

ablación, y sus efectos sobre la memoria de H.M. (Milner, 1972; Scoville y Milner, 1957), se sabía muy poco de la anatomía del lóbulo temporal medial, y no se sabía cuál era el daño específico dentro de esta área tan extensa que era responsable del deterioro en la memoria de H.M. Este déficit de la memoria fue trasladado a un modelo animal en primates no humanos (Mishkin et al., 1982; Squire y Zola-Morgan 1991). Los hallazgos confirmaron la participación de áreas temporales como el hipocampo y las cortezas adyacentes a éste en el almacenamiento de información.

En un lapso de 10 años, el conjunto de trabajos conductuales con el modelo animal logró identificar, junto con los estudios neuroanatómicos, los componentes anatómicos del sistema de memoria del lóbulo temporal medial (Squire y Zola-Morgan, 1991, Corkin et al., 1997): la región hipocampal (los campos CA, el giro dentado y el complejo subicular) y las cortezas entorrinal, perirrinal y parahipocampal que conforman gran parte del giro parahipocampal, y una porción del complejo amigdaloides. Los estudios anatómicos describieron los límites y las conexiones de todas estas áreas, inicialmente en el mono y posteriormente en la rata (Burwell et al., 1995; Lavenex y Amaral, 2000, Suzuki y Amaral, 1994). El hipocampo se encuentra al final de la jerarquía del procesamiento cortical, y la corteza entorrinal es el origen más importante de sus proyecciones corticales. En el mono, casi dos terceras partes de la información cortical que ingresa a la corteza entorrinal se originan en las cortezas perirrinal y parahipocampal adyacentes, que a su vez reciben amplias proyecciones provenientes de zonas unimodales y polimodales de los lóbulos frontal, temporal y parietal, así como también de la corteza retrosplenial. En la época en la que se identificó este sistema de memoria fue posible entender que este sistema es muy importante específicamente para la memoria declarativa (Schacter y Tulving, 1994; Squire, 1992). Mientras que distintas formas de memoria no declarativa dependen de la integridad de sistemas específicos del cerebro, entre los que se incluyen por ejemplo el neocórtex, la amígdala y el cerebelo (Eichenbaum y Cohen, 2001; Squire y Knowlton, 1999). Como primera

aproximación, podemos decir que todas las estructuras del lóbulo temporal medial participan de alguna manera en la memoria declarativa. Los pacientes con evidencia histológica de un daño limitado principalmente a la región hipocampal (los pacientes R.B., G.D., L.M. y W.H.; Rempel-Clower et al., 1996; Zola-Morgan et al., 1986) presentan un deterioro grave en la memoria, pero menos grave que el que se observa en pacientes con lesiones más amplias que incluyen a la corteza temporal medial adyacente al hipocampo (los pacientes H.M. y E.P.; Corkin et al., 1997; Stefanacci et al., 2000). En concordancia con lo anterior, las comparaciones sistemáticas hechas en monos con lesiones hipocampales limitadas mostraron un deterioro moderado, mientras que los monos con lesiones que incluían la región hipocampal y también la corteza adyacente mostraban un deterioro grave (Zola-Morgan et al., 1994). Un estudio reciente mostró que al parecer los sistemas que se encargan de almacenar memoria declarativa versus memoria de procedimientos no son tan independientes como se cree, Brown y Roberston (2007) observaron que una tarea de procedimiento interfiere con la consolidación de la memoria declarativa en el mismo sujeto, sin embargo si hay presencia de sueño después la fase experimental para la memoria declarativa, ésta se consolida correctamente, lo que nos lleva a creer que durante la etapa de sueño las conexiones entre áreas subcorticales y corticales son fortalecidas de forma independiente. En modelos animales se han demostrado que el hipocampo es el almacenaje temporal de la memoria y que es necesaria la comunicación continua con la corteza cerebral, para que dicho almacenaje de corto plazo, se consolide en un trazo más duradero, llamado, memoria de largo plazo (Remondes y Schuman, 2004; Wiltgen et al., 2004).

Del conjunto de conocimientos de todas las áreas relacionadas con el estudio del cerebro, ha emergido un concepto que por sus características echó abajo la teoría del cerebro como un órgano no modificable, se pensó por mucho tiempo que el cerebro maduro permanecía estático y no era capaz de regenerarse, sin embargo, comenzaron a surgir evidencias de un fenómeno conocido como

plasticidad. La plasticidad se refiere a una propiedad intrínseca del cerebro humano que representa la capacidad del sistema nervioso para adaptarse al medio ambiente, a los cambios fisiológicos y a la experiencia. Un fenómeno relacionado con la plasticidad sináptica, es el aprendizaje. Se ha propuesto que la potenciación de largo plazo es un fenómeno que involucran cambios en la fortaleza de las conexiones sinápticas. La LTP subyace a la plasticidad sináptica, ocasionada, ya sea por el aprendizaje o por la recuperación inmediata después de alguna lesión en el sistema nervioso. La LTP se ha observado en modelos animales, y es obtenida tras la estimulación de alta frecuencia, por la administración de moléculas como segundos mensajeros, proteínas cinasas o factores tróficos y/o por el entrenamiento en algunas tareas de aprendizaje (Huang et al., 1994; McKernan y Gallagher, 1997; Patterson et al., 2001; Escobar et al., 2003; Whitlock et al., 2006).

La potenciación de largo plazo

Características de la potenciación de largo plazo

La memoria, se refleja en la capacidad de las neuronas para modular las respuestas evocadas por un estímulo y para reactivar una respuesta en ausencia del estímulo que la originó (Eichenbaum, 1997). Es por esto que es posible considerar ciertos eventos de neuromodulación (habilidad que presentan las neuronas para alterar sus respuestas eléctricas como consecuencia de cambios bioquímicos intracelulares), resultantes de estimulación sináptica u hormonal, como la base de procesos de plasticidad en sistema nervioso, tales como el aprendizaje y la memoria. Se considera a la plasticidad sináptica como los cambios en las propiedades funcionales de la sinapsis como producto de su actividad. Para entender los procesos de aprendizaje y memoria es necesario recordar que el cerebro se estructura a través de redes neuronales, cuyas neuronas se comunican mediante sinapsis. Se considera a la sinapsis, como el lugar en el que se efectúan las modificaciones que conducen al almacenamiento de información de aquellas neuronas involucradas en ciertos tipos de aprendizaje. Donald Hebb (1949) postuló que cuando

“el axón de una célula A está suficientemente cerca para excitar a una célula B y repetida o persistentemente toma parte de su activación, algún cambio de proceso de crecimiento o cambio metabólico tiene lugar en alguna de las dos células, de modo que la eficacia en A para activar a B incrementa”, actualmente conocemos un modelo que puede explicar estas modificaciones plásticas del sistema nervioso. En 1973 Bliss y Lomo encontraron que trenes breves de alta frecuencia aplicados a las aferentes excitatorias del hipocampo de los conejos, causaban un incremento en la fortaleza de la transmisión sináptica que podía durar días e incluso semanas en animales intactos, a lo que se llamó potenciación a largo plazo. Desde su descubrimiento, la LTP de la transmisión sináptica excitatoria del hipocampo, se ha convertido en uno de los modelos experimentales primarios para examinar los mecanismos de almacenamiento de la información. Además de su persistencia en el tiempo, la LTP posee características que la convierten en una poderosa herramienta para explicar los eventos que a nivel celular, bioquímico o inclusive molecular, subyace a la plasticidad sináptica relacionada con la memoria. Esta característica son: la especificidad, la cooperatividad y la asociatividad (Bailey et al., 2000). La especificidad se refiere a que solamente aquellas fibras que fueron activadas por el estímulo de alta frecuencia van a presentar modificaciones en la respuesta sináptica. La cooperatividad se manifiesta por un fuerte requerimiento en la actividad simultánea de las fibras presinápticas, de tal forma que se logre el estímulo necesario para activar la LTP. Finalmente, la asociatividad que se observa cuando la activación de una vía sináptica fuerte es capaz de facilitar en una sinapsis débil en la misma célula (Malenka y Nicoll, 1993). La relación de este fenómeno con el procesamiento de información ha sido profusamente estudiada en el hipocampo y otras regiones del SNC. Algunos de los puntos que hacen pensar a los investigadores que la LTP y los procesos de aprendizaje y memoria son similares son: que la LTP puede operar en las redes de neuronas que se han visto involucradas con procesos de aprendizaje y memoria (hipocampo, amígdala, neocorteza etc.), dura un lapso prolongado y funciona de manera similar al postulado de Hebb (Martínez y Derrik, 1996). Un ejemplo clásico al respecto de la

relación entre LTP, el aprendizaje y memoria es el estudio de Morris (1989), en donde la interrupción de la transmisión sináptica dependiente de los receptores NMDA (N-metil de aspartato) en ratas, los cuales se han visto involucrados ampliamente en procesos de aprendizaje y memoria, provoca el bloqueo tanto del aprendizaje en la tarea espacial del laberinto de agua como en la inducción de LTP hipocampal. Evidencias similares se han encontrado con ratones transgénicos que sobreexpresan una subunidad de los receptores NMDA, logrando un incremento en la tarea de aprendizaje y facilitación de la LTP (Tang et al., 1999).

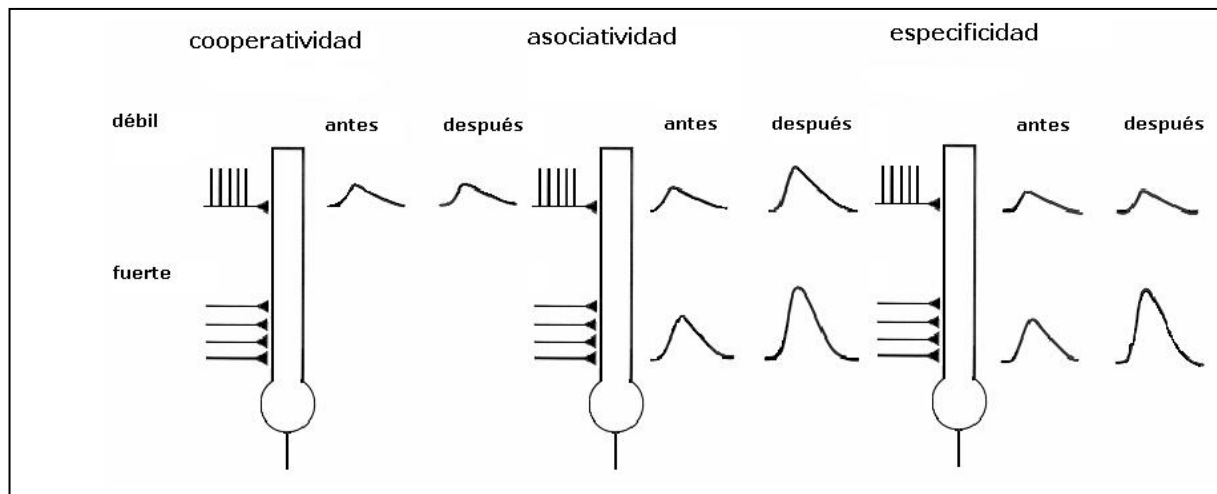


Figura 1. Características de la LTP, postuladas por Hebb en 1949, cooperatividad, asociatividad y especificidad.

Mecanismos moleculares de la LTP

Los mecanismos moleculares que subyacen al establecimiento y mantenimiento de la LTP han sido ampliamente estudiados en las vías del hipocampo, particularmente en la vía colateral de Schaffer en la región CA1. En la actualidad se conoce que mecanismos similares tienen lugar en regiones neocorticales. Las vías excitatorias en el hipocampo, como en muchas otras zonas del sistema nervioso,

utilizan glutamato como neurotransmisor (Kennedy y Marder, 1992). Experimentos realizados utilizando antagonistas de los receptores NMDA (N-metil de aspartato), como el AP5 (D-2-amino-5-fosfonovalerato), evitan la inducción de LTP (Collingridge et al., 1983; Harris et al., 1984). Estos receptores se encuentran generalmente inactivos. Durante la actividad normal de las conexiones sinápticas, las terminales presinápticas liberan glutamato en el espacio extracelular y, este neurotransmisor activa a los receptores AMPA (ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico) de la célula postsináptica, dando lugar a la entrada de sodio al interior de la célula. Los receptores NMDA, también responden a glutamato, pero se encuentran bloqueados por magnesio, lo que impide el intercambio iónico a través de ellos. Para eliminar este bloqueo es necesaria la depolarización de la membrana, lo que ocurre por la entrada de iones a través de otros canales como el tipo AMPA (Kandel y Hawkins, 1992). Esto otorga a los receptores NMDA la propiedad de funcionar como detectores asociativos, ya que se activan solo cuando coinciden, la actividad de la célula presináptica y la depolarización de la membrana de la célula postsináptica (Bliss y Collingridge, 1993; Malenka, 1994). Los receptores NMDA tienen además la característica de que al ser activados permiten, no solamente la entrada de iones de sodio al interior de la célula sino que también son permeables a calcio (MacDermoto et al., 1986; Jahr y Stevens, 1987; Ascher y Nowak, 1988). Es la entrada de calcio, a través de estos canales y probablemente a través de canales de calcio dependientes de voltaje, lo que hace posible la presencia de la LTP, al provocar cambios en el interior de la célula. La entrada de calcio al interior de la célula postsináptica, a través de los receptores NMDA, activa a la proteína citosólica llamada calmodulina, que funciona como una señal para activar distintas vías de transducción al interior de la célula, haciendo posible el mantenimiento del incremento en la eficacia sináptica por periodos prolongados (Kennedy y Marder, 1992). El papel explícito que juega CaMK-II (proteína cinasa dependiente de calcio-calmodulina II) en el incremento de la eficacia sináptica fue descrito en 1997 por Barria y su grupo, al demostrar que su activación se correlaciona con el aumento en los niveles de fosforilación de los

receptores AMPA (Barria et al., 1997). Con este trabajo fue posible plantear por primera vez, un modelo de los cambios a nivel molecular que tienen lugar durante la inducción de la LTP que permite su mantenimiento, al menos en el mediano plazo. Se ha demostrado que el mantenimiento de la LTP por periodos prolongados (mayores de una hora) hasta un año (Abraham et al., 2002) es dependiente de la síntesis de proteínas (Nguyen et al., 1994). En los últimos años se ha determinado que la entrada de calcio, por intermediación de la proteína calmodulina, causa entre otras cosas, la activación de la glicoproteína adenil ciclasa; esta proteína produce adenosin monofosfato cíclico (AMPC) a partir de moléculas de adenosin trifosfato (ATP) (Kennedy y Marder, 1992). Este nucleótido es utilizado como mensajero en un sinúmero de cascadas de transducción celular. Durante la inducción de la potenciación a largo plazo, AMPC producido, activa a la proteína cinasa A (PKA). Huang et al., (1994) mostraron que la potenciación a largo plazo decae si la actividad de esta proteína es bloqueada. Al ser activada la proteína PKA ocurre la disociación de su unidad reguladora de la catalizadora, permitiendo la translocación de la segunda al interior del núcleo (Hagiwara et al., 1993). Una vez al interior transfiere grupos fosfatos para la activación de factores de transcripción CREB (proteína de unión al elemento responsivo al AMPC) (Hagiwara et al., 1993) que participa en la modulación de la transcripción de una gran variedad de genes que contienen sitios sensibles a ella, denominados CRE (elementos responsivos al AMPC) (Silva et al., 1998). De hecho a través de la administración de análogos y agonistas del AMPC se ha probado la decisiva participación de este segundo mensajero tanto en el mantenimiento prolongado de la LTP, como en la consolidación de tareas aversivas (Huang et al., 1994; Roesler et al., 2002; Miranda y McGaugh, 2003) [Fig. 2]. Recientes estudios han mostrado la importancia de los factores tróficos en la LTP. La expresión de los genes que codifican los factores de crecimiento BDNF y NGF aumenta tras la inducción de la LTP (Bramham et al., 1996; Morimoto, 1998). El aumento de la transcripción de genes que codifican factores de crecimiento así como moléculas de adhesión celular podría constituir la conexión entre el incremento en la eficacia sináptica y las

modificaciones estructurales de los sitios sinápticos que se han observado tras la inducción de LTP (Edwards, 1995; Finkbeiner et al., 1997, Pang et al., 2004). Una elegante investigación demostró que el BDNF maduro rescata la LTP tardía cuando la síntesis proteica está inhibida; esto sugiere que el BDNF es un producto proteico clave para el mantenimiento de cambios plásticos prolongados. Bekinschtein et al. (2007) observaron que la presencia de BDNF hipocampal es necesaria 12 horas posteriores al entrenamiento de una tarea espacial en ratas para la persistencia del almacenamiento de información. Otra molécula con injerencias en el mantenimiento de la plasticidad sináptica por tiempos prolongados es PKM ζ . Pastalkova et al. (2006), descubrieron que tras inhibir a PKM ζ , la LTP mantenida por varias horas es bloqueada, aunado a la pérdida total de la memoria espacial que ya había sido establecida previamente. Referente a lo anterior, un artículo surgido recientemente demostró la participación de PKM ζ en el mantenimiento de la memoria aversiva a los sabores, tras infundir ZIP (inhibidor para PKM ζ) 25 días después de la adquisición del CAS, las ratas no presentan aversión al sabor, mostrando así un alto déficit en la recuperación de la información que ya había sido almacenada con anterioridad (Dudai y Sacktor, 2007). Por otra parte Kelly et al. (2007), observaron que la polimerización de actina es necesaria para la síntesis de la proteína PKM ζ , y consecuentemente promueve el mantenimiento de la LTP. Este mismo grupo de investigación mostró el requerimiento de proteínas como PKA, CaMKII, MAPK, mTOR para la activación prolongada de PKM ζ ; asimismo también encontraron que PKM ζ forma un complejo con PDK1 para el mantenimiento y sostenimiento de su activación. Otra molécula involucrada en el mantenimiento de la LTP y la consolidación de la información es CaMKII (Sanhueza et al., 2007; Cho et al., 2007). Lo anterior indica la participación de proteínas para el mantenimiento de la LTP tardía, así como para el mantenimiento del trazo de la memoria por ventanas de tiempos prolongadas.

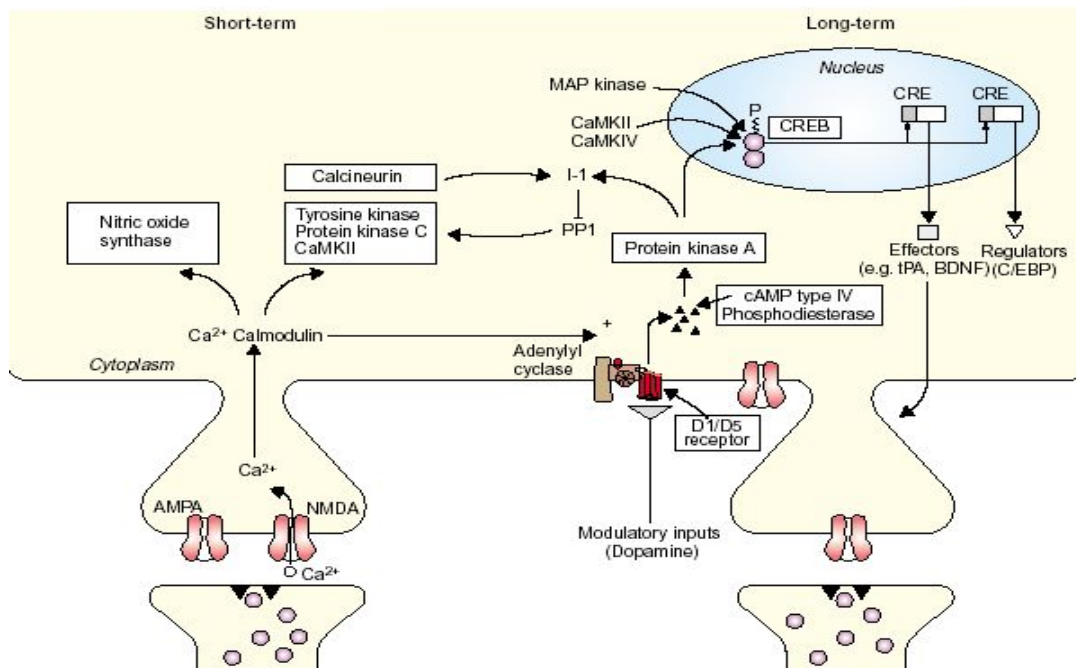


Figura 2. Mecanismos moleculares de la transmisión sináptica tras la inducción de la LTP (Kandel, 2001).

LTP y conducta

La evidencia hasta el momento más sólida a favor de una relación entre el aprendizaje y la LTP, provienen de dos estudios realizados por dos grupos independientes, no en el área del hipocampo sino en la amígdala (McKernan y Shinnick-Gallagher, 1997; Rogan et al., 1997). Los resultados de estos trabajos sugieren que el condicionamiento al miedo, causa incremento de largo plazo en la eficiencia sináptica en la vía que transmite información auditiva del núcleo geniculado medial del tálamo, a la amígdala lateral. Rogan et al., (1997) demostraron *in vivo* que el condicionamiento al miedo produce incrementos en la pendiente y la amplitud de los potenciales postsinápticos excitatorios (PPSE's) en la amígdala lateral de ratas adultas, similares a los vistos después de inducir LTP *in vivo*. Por otra parte McKernan y Shinnick-Gallagher (1997) demostraron que el entrenamiento en el condicionamiento al miedo produce una facilitación presináptica de la amígdala lateral en preparaciones *in*

vitro, 24 hr después del entrenamiento de dicha tarea en ratas adultas. Trabajos anteriores habían mostrado el papel de la amígdala en el condicionamiento al miedo, y la LTP se había propuesto como candidato a ser el mecanismo celular de este aprendizaje (Maren, 1996). Esta serie de estudios sugieren que las vías de señalización molecular requeridas para la memoria a largo plazo del condicionamiento al miedo en la amígdala lateral son las mismas que se requieren durante la inducción y mantenimiento de la LTP en esta tarea (Rogan et al., 1997; Fanselow y LeDoux, 1993; Huang et al., 2000; Blair et al., 2001). Concordante con lo anterior pero en el hipocampo un estudio reciente demostró el incremento de la eficacia sináptica en CA1 en ratas adultas *in vivo* (Whitlock et al., 2006).

Las investigaciones mencionadas presentan evidencia clara a favor de la relación entre LTP y aprendizaje. Concordante con esto Rioult-Pedotti et al., demostraron que la corteza motora primaria de ratas adultas presentó cambios en la eficacia sináptica debido a una tarea de aprendizaje, después de haber realizado una tarea de aprendizaje de habilidad motora (motor skill learning). La amplitud de los EPSPs en la corteza motora primaria del hemisferio entrenado aumentó significativamente con respecto a la corteza motora primaria del hemisferio contralateral (Rioult-Pedotti et al., 1998). Monfils y Teskey en el 2004, observaron los mismos cambios inducidos por una tarea de aprendizaje motor en la corteza somatosensorial. Otra investigación demostró que al inducir LTP y LTD en el hemisferio entrenado con la tarea de aprendizaje motor, la LTP fue significativamente reducida mientras que la LTD fue significativamente incrementada (Rioult-Pedotti et al., 2000). Estas evidencias sostienen la hipótesis de que durante el aprendizaje existen incrementos de la eficiencia sináptica similares a los que ocurren en la LTP. Así mismos el último estudio concuerda con la hipótesis de metaplasticidad, fenómeno descrito inicialmente por Abraham y Bear en 1996.

Plasticidad homeostática

Metaplasticidad

Se han observado cambios subsecuentes al inducir LTP en una misma vía, estos cambios incluyen una inhibición de la LTP y una facilitación de la LTD (Malenka, 1991; Huang et al., 1992) a este fenómeno se le define como metaplasticidad. La metaplasticidad es el cambio en la habilidad para inducir subsecuentes cambios en la plasticidad sináptica (Escobar y Derrick, 2007). Este cambio es más evidente cuando no está acompañado de modificaciones en la eficiencia sináptica, pero se ha descrito que la metaplasticidad y los cambios en la eficiencia sináptica pueden ser inducidos simultáneamente por la misma actividad sináptica. En 1982 Bienestock et al., propusieron la existencia de un umbral de activación postsináptica, es decir, una vía es potenciada cuando la activación postsináptica excede un valor crítico llamado umbral de modificación o θ_m [Figura 3], mientras que una vía es depotenciada cuando la activación postsináptica es mayor que cero pero menor que el valor θ_m . Es importante recalcar que este umbral no es fijo (Bienestock et al., 1982; Cooper et al., 1979). La frecuencia de estimulación, es directamente proporcional a la activación de la postsinapsis, esto es, que a frecuencias más altas se da una mayor activación de la postsinapsis, mientras que a frecuencias más bajas la activación es menor, por lo cual el nivel de potenciación o depotenciación depende de la frecuencia de estimulación (Bear, 1996). La modificación del umbral es temporal y es considerado como un mecanismo homeostático que protege a las neuronas, por ejemplo, de estímulos de muy alta intensidad o frecuencias que pudiera provocar excitotoxicidad (Bear, 2003). Asimismo los cambios metaplásticos están representados en diferentes áreas del sistema nervioso central como en la neocorteza o el hipocampo (Bear, 1996). Quinlan et al., 2004 utilizaron una tarea de discriminación olfativa y subsecuentemente indujeron LTP. Se observó que la tarea de discriminación olfativa disminuyó la LTP inducida con trenes de alta frecuencia de estimulación en la corteza piriforme, relevo final de la vía olfativa (Quinlan et al., 2004). Se cree que el aprendizaje, además de inducir cambios en la eficiencia

sináptica, también incrementa el umbral para futuros cambios en la eficiencia sináptica (θ_m), Los resultados de Quinlan et al., 2004 y Rioult-Pedotti et al., 2000, constituyen grandes evidencias que apoyan la hipótesis de metaplasticidad. En seres humanos se han realizado investigaciones que relacionan al aprendizaje con los cambios en la excitabilidad de las neuronas. En una tarea de aprendizaje se entrenó a un grupo de sujetos a incrementar la velocidad en el movimiento de su dedo pulgar, este aprendizaje está asociado con un cambio rápido en la excitabilidad de la corteza motora primaria, similar a lo encontrado por Rioult- Pedotti et al., 1998 (Muellbacher et al., 2001). La plasticidad en el área motora primaria de humanos es inducida por la aplicación de 200 pulsos de estimulación eléctrica al nervio medial de la mano derecha seguido de estimulación magnética transcraneal al área correspondiente a la representación de la mano en la corteza motora primaria, lo cual provoca un incremento similar a la LTP o un incremento similar a la LTD en los potenciales motores evocados de forma análoga a lo que sucede con los EPSPs en la LTP y LTD (Stefan et al., 2000; Wolters et al., 2003). Ziemann et al. (2004) entrenaron a un grupo de sujetos humanos a una tarea motora. Los resultados mostraron que de forma análoga a la LTP y la LTD en el área motora primaria de las ratas adultas, la tarea de aprendizaje produce un decremento en la potenciación de la eficiencia sináptica, lo cual puede explicarse como una modificación del umbral θ_m y un ejemplo metaplástico. Estos experimentos han llevado a la comunidad neurocientífica a suponer que los mecanismos como potenciación y depresión de largo plazo en la eficiencia sináptica o metaplasticidad, no solo tienen injerencia en varios niveles (tanto anatómicos como filogenéticos), sino que son mecanismos que subyacen a funciones adaptativas como la memoria.

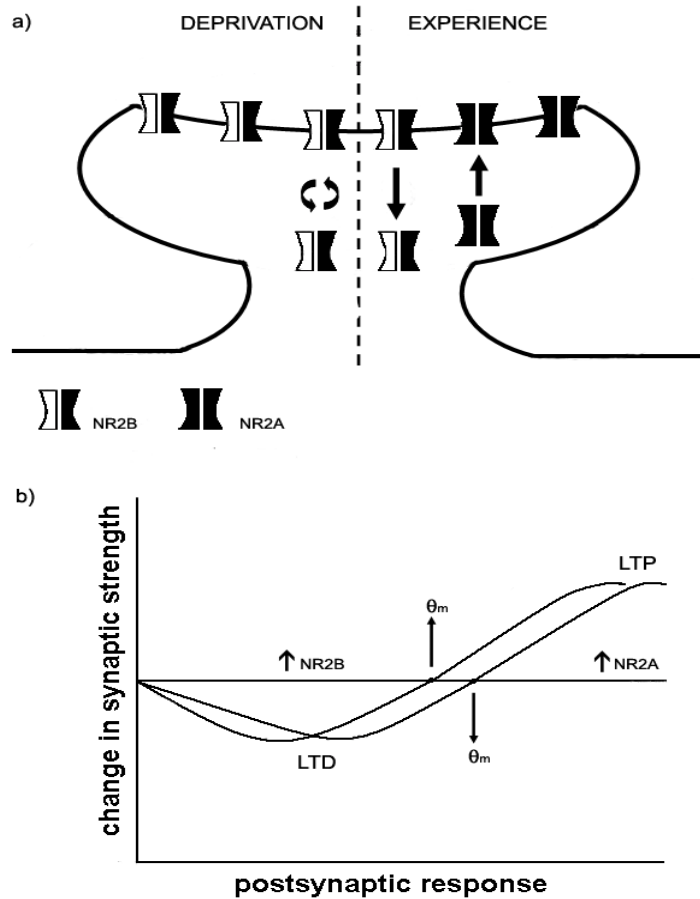


Figura 3. Modelo teórico de metaplasticidad. a) Actividad de las subunidades de los receptores NMDA en un evento metaplástico. b) Modificación del umbral θ_m en respuesta a la actividad.

El presente estudio se ha basado en tres importantes investigaciones que demuestran un efecto metaplástico debido a la facilitación de la vía BLA-CI. Escobar et al., (1998) observaron que tras la inducción de potenciación de largo plazo en la corteza insular, hay un incremento en la retención del condicionamiento aversivo a los sabores. En otra investigación se observó que la infusión de BDNF solo en la corteza insular, de forma similar a la estimulación de alta frecuencia, induce un fenómeno similar a la LTP (Escobar et al., 2003). Una investigación aún más reciente en la que se basa gran parte de los hallazgos en este estudio, demostró que la infusión de BDNF en la

corteza insular incrementa la retención del condicionamiento aversivo a los sabores (Castillo et al., 2006). Lo que indica la participación de la proteína BDNF, proteína que forma parte de la familia de los factores neurotróficos, en los mecanismos que subyacen el almacenamiento de información.

Los factores neurotróficos y el sistema nervioso central

La diversidad celular en el sistema nervioso central se origina a partir de la acción concertada de los procesos de proliferación celular, diferenciación, crecimiento, migración, sobrevivencia y formación de las sinapsis. Entre los mensajeros involucrados en la comunicación neuronal, que da origen a estos procesos, se encuentran ciertas moléculas denominadas factores tróficos o factores neurotróficos (FNT), que son proteínas que controlan la sobrevivencia, el crecimiento y las capacidades funcionales de poblaciones específicas de neuronas (Escobar, 1994). La familia de las neurotrofinas está constituida por los siguientes miembros: factor de crecimiento neuronal (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina 3 (NT-3), neurotrofina 4/5 (NT-4/5), NT-6 y NT7. Las neurotrofinas efectúan sus acciones mediante dos clases de receptores, los de alta afinidad, denominados tirosina cinasas (receptores Trk) y los receptores de baja afinidad denominados p75; hay evidencia de que ambos receptores forman un complejo incrementado así la selectividad al ligando [Fig. 4] (Chao, 1992, Meakin y Shooter, 1992; Barbacid, 1994; Dechant et al., 1994; Lindsay et al., 1994; Teng y Hempstead, 2004; Chao, 2006; Reichardt, 2006).

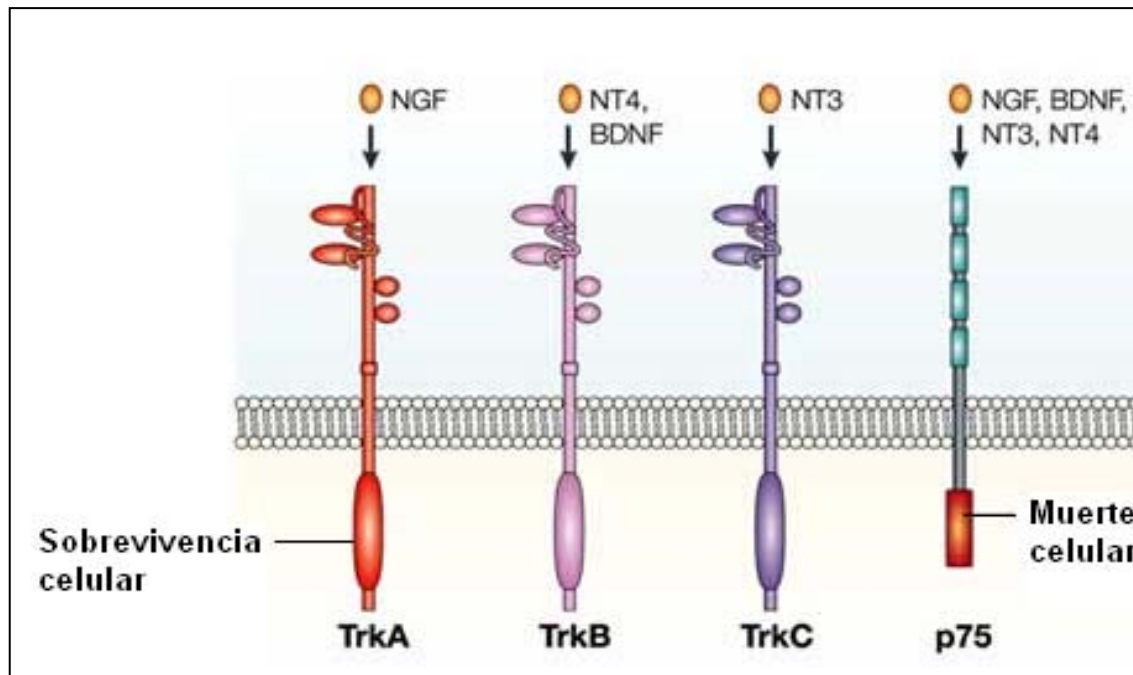


Figura 4. Neurotrofinas ligadas a su receptor de alta afinidad Trk y a su receptor de baja afinidad p75, (modificada de Chao, 2003).

El factor neurotrófico derivado del cerebro

El BDNF es una molécula trófica, cuyo peso molecular es de 27 KDa que fue originalmente aislada del cerebro de cerdo. Actualmente sabemos que forma parte del SNC de los mamíferos en particular en el hipocampo y la neocorteza. Recientes investigaciones muestran la presencia de BDNF y sus receptores TrkB, en el núcleo central de la amígdala (Agassandian et al., 2006), en la vía visual (Avwenagha et al., 2006) y en densidades postsinápticas de la corteza cerebral en ratas adultas (Aoki et al., 2000). El BDNF interactúa con su receptor de alta afinidad llamado TrkB, la cadena de señalización que activa esta interacción incluye, la mayoría de las veces una cascada de proteínas cinasas, las cuales se caracterizan por transferir un grupo fosfato a sus sustratos, fosforilando a otras cinasas que translocan al

núcleo y esto trae consigo modificaciones en el proceso celular (Finkbeiner et al., 1997; Minichiello et al., 2002; Ying et al., 2002; Reichardt, 2006). El BDNF se encuentra ampliamente involucrado en la modulación de ambas expresiones de plasticidad sináptica, y puesto que las cascadas metabólicas que se desencadenan tras su interacción con el receptor TrkB convergen en la modulación de la transcripción génica descrita, resulta evidente su participación en los procesos de aprendizaje y memoria (Soulé et al., 2006; Bramham, 2007; Gómez-Palacio y Escobar, 2007; Bekinschtein et al., 2007).

BDNF y plasticidad sináptica

Evidencias recientes señalan que el BDNF efectúa acciones diferentes a los señalados de manera clásica sobre la diferenciación y la sobrevivencia neuronales antes descritos, como por ejemplo la protección ante algunos agentes excitotóxicos, la modulación de la expresión peptídica, etc. En los últimos años, se ha considerado la muy relevante posibilidad de que las neurotrofinas, y en especial el BDNF, se involucren en la regulación de la plasticidad sináptica dependiente de la actividad (Carmignoto et al., 1997; Walz et al., 2006). Esto se debe a que se expresan en áreas del cerebro en donde hay una importante expresión de plasticidad, la actividad regula sus niveles de secreción y, estas a su vez regulan tanto la transmisión sináptica como el crecimiento neuronal (McAllister et al., 1999, Walz et al., 2006). Esta posibilidad se ve respaldada por numerosos hallazgos, entre los que podemos mencionar, que la expresión de BDNF en la neocorteza visual experimenta un rápido y significativo incremento debido a la actividad neuronal (Bozzi et al., 1995); asimismo en la corteza insular tras la infusión de BDNF se incrementa la eficacia sináptica (Escobar et al., 2003). De manera similar la inducción de LTP en el giro dentado hipocampal, incrementa los niveles de ARN mensajero de BDNF, NT-3 así como del receptor TrkB (Bramham et al., 1996; Morimoto et al., 1998). Cepas de ratón carentes del gen que codifica para la expresión de BDNF, exhiben una disminución significativa en la expresión de LTP hipocampal (Korte et al., 1995; Patterson et al., 1996, Patterson et al., 2001). Aunado a lo

anterior, se ha reportado que la adición de BDNF o NT-3 produce dramáticos incrementos de larga duración en la transmisión sináptica (similares a la LTP) en rebanadas o cultivos neuronales hipocampales procedentes de roedores adultos (Levine et al., 1995; Kang y Schuman, 1995). La investigación en torno a las neurotrofinas endógenas, en especial al BDNF en la generación y modulación de la LTP así como la reorganización estructural de las sinapsis, ha experimentado en años recientes un auge considerable (Schuman, 1997; Lu y Chow, 1999; Chen et al., 1999; Minichiello et al., 1999; Aoki et al., 2000; Muller et al., 2000; Schinder y Poo, 2002; Winbrand et al., 2006). Se ha reportando que cómo resultado de la activación de TrKB se desencadenan tres cascadas metabólicas principales: MAPK, PI3-K y PLC γ (Huang y Reichardt, 2003) [Fig. 5]. Recientemente se ha demostrado que la infusión de BDNF en la corteza insular, es capaz de inducir LTP, en ausencia de estimulación eléctrica de alta frecuencia (Escobar et al., 2003). La corteza insular es un área involucrada en la adquisición y almacenamiento de tareas aversivas como el condicionamiento aversivo a los sabores (CAS), es un paradigma ampliamente utilizado por sus implicaciones en la sobrevivencia y adaptación de las especies, al cual nos referiremos a continuación.

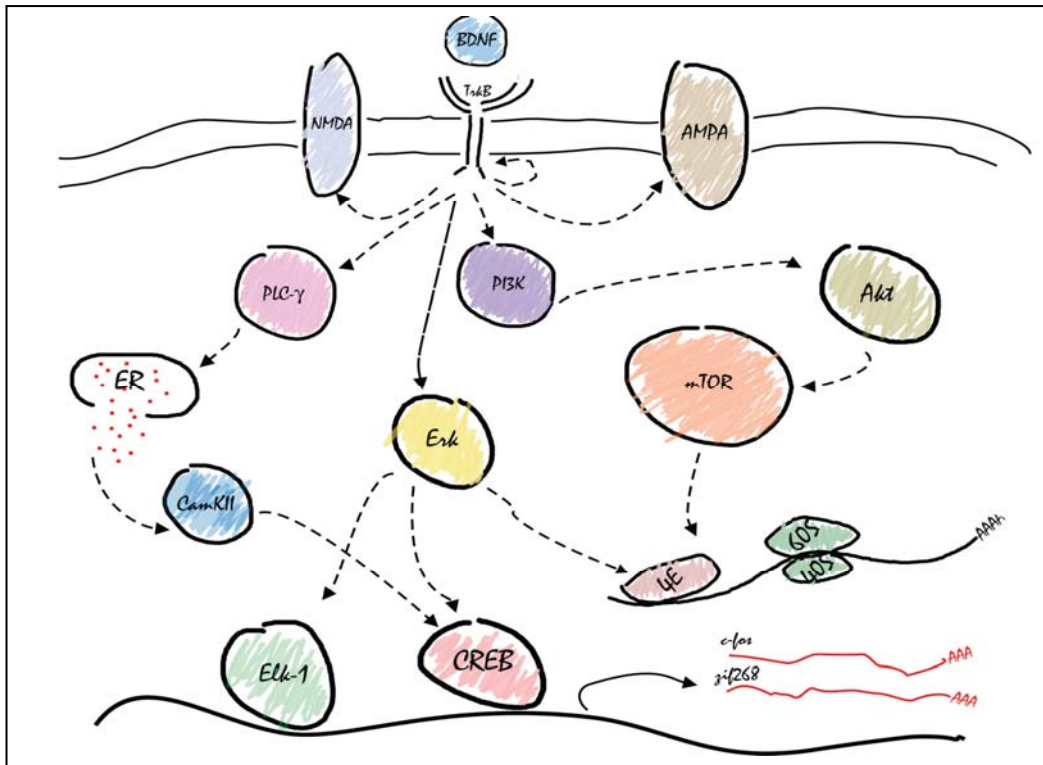


Figura 5. Vías de señalización activada por la interacción BDNF/TrkB. Abreviaciones: MAPK – proteínas cinasas activadas por mitógenos; PI3-K – fosfatidilinositol-3 cinasa; IP3 – inositol 1,4,5-trifosfato; PLCγ – fosfolipasa Cγ; ER-retículo endoplásmico; Erk - proteína cinasa regulada extracelularmente; Akt/PKB - proteína cinasa B; mTOR - blanco a la rapamicina; CaMKII - proteína cinasa dependiente de calcio II; CREB – elemento responsable al AMPc; 4E - factor de iniciación eucariótico; Elk - proteína similar a S6. (Bekinschtein, et al., 2007).

Condicionamiento aversivo a los sabores

Todos los seres vivos tienen la necesidad de obtener las sustancias que les aseguren un aporte adecuado de energía para la realización de sus actividades diarias. Estas sustancias son obtenidas mediante la ingestión de comida y las subsecuentes transformaciones metabólicas de dicho alimento en el cuerpo, para que el organismo sea capaz de obtener los nutrientes que requiere, es necesario que desarrolle nuevas conductas que incluyen el reconocimiento de necesidades corporales ante un bajo nivel de energía o la necesidad de alguna sustancia en particular (sensación de hambre), identificar si la sustancia ingerida es capaz de cubrir sus necesidades

energéticas con el fin de encontrar y consumir las cantidades adecuadas, y por último, regular los procesos que lleva a cabo la ingesta de alimentos. El gusto es un proceso neuronal complejo, que necesita de la integración de información recibida de fibras especializadas en sabor, fibras orosensoriales y gastrointestinales, que le permiten al organismo evitar conductas alimentarias nocivas (Simon, et al., 2006). Por lo anterior, resulta clara la importancia evolutiva que ha tenido el desarrollo de mecanismos neuronales sumamente especializados capaces de controlar de modo eficiente la ingesta de los alimentos y las consecuencias de éstos para cada organismos (Bures, 1998). Es indispensable que cada ser vivo aprenda y recuerde aquello que lo nutre o lo enferma. Hasta la fecha se conoce que existe una estrecha asociación entre estímulos viscerales y los estímulos externos, es normal que cuando un estímulo externo es asociado a una sensación de malestar físico la respuesta adecuada sea evitar ese estímulo.

El condicionamiento aversivo a los sabores (CAS) es un paradigma de aprendizaje ampliamente utilizado para el estudio de los procesos de aprendizaje y memoria. En este modelo conductual un animal adquiere aversión ante un estímulo gustativo novedoso cuando éste se asocia con una irritación gástrica. El condicionamiento aversivo a los sabores fue originalmente descrito por García, 1955 quien encontró que si colocaba un bebedero de agua con la punta de plástico en el interior de una cámara de radiación, el animal no volvería a beber en un bebedero con esa clase de punta aun afuera de la cámara de radiación. Para García este era un claro ejemplo de aprendizaje, en el que el animal relacionaba el sabor con algún efecto de malestar. Más tarde surgió un paradigma que se obtuvo con el pareamiento del sabor y un estímulo que produjera irritación gástrica como el cloruro de litio (LiCl) (García y Koellin, 1967), fue entonces cuando a este paradigma se le llamó condicionamiento aversivo a los sabores. Tras el descubrimiento del CAS se comenzaron a estudiar los mecanismos cerebrales de los procesos de aprendizaje gustativo. Los resultados fueron múltiples, sin embargo el más sobresaliente fue en 1972 cuando se reportó que la región cortical conocida en ese

entonces como corteza gustativa estaba involucrada en el CAS, en vista de que las lesiones en esta región producía considerables déficit en el aprendizaje de la evitación al sabor (Bermúdez-Rattoni, 2004). Entre las similitudes que presenta el CAS con respecto al condicionamiento clásico es posibles mencionar su tendencia a generalizar (la aversión de un sabor se extiende a alimentos o sustancias con sabores similares), presenta un periodo de extinción, es decir, un debilitamiento de la respuesta condicionada ya establecida (con la particularidad de que en el CAS la extinción es resistente), y que el condicionamiento es muy fuerte cuando el estímulo condicionado (EC) es novedoso. En el caso del CAS una de las características más importantes es su selectividad a los estímulos gustativos, es decir, un solo entrenamiento basta para obtener una fuerte respuesta aversiva ante sabores novedosos (Bernstein, 1991; Bernstein y Koh, 2007).

Por otra parte en el CAS existe la peculiaridad de que la asociación entre el estímulo condicionado y el estímulo incondicionado (EI) está mediada por tiempos bastantes amplios desde minutos hasta horas. Bures (1998) postuló la formación de la memoria gustativa a corto plazo al ser presentado el estímulo condicionado. La memoria gustativa a corto plazo requiere de la participación de la neocorteza donde puede asociarse finalmente el estímulo incondicionado y así formar la memoria gustativa de largo plazo.

Corteza insular: sustrato anatómico del CAS

Los sustratos anatómicos utilizados en el aprendizaje del CAS han sido bien establecidos (Kiefer, 1985; Braun et al., 1982). En este sentido se ha demostrado que las lesiones bilaterales de la corteza insular (CI) afectan la adquisición y retención del CAS (Bernstein y Koh, 2007; Yamamoto et al., 2007). Debido a que las lesiones de la CI no producen deficiencias en la capacidad gustativa o gastrointestinal, se ha sugerido que la corteza insular afecta la representación mnémica de los sabores y sus consecuencias gastrointestinales (Kiefer, 1985). En estudios similares se ha observado que al combinar lesiones bilaterales de la CI con lesiones

en la amígdala la respuesta del CAS se agudiza (Yamamoto et al 1995), lo que resalta la estrecha conectividad entre la CI y la amígdala para la adquisición y recuerdo de esta tarea.

La corteza insular, es un área neocortical ubicada en las regiones 13 y 14 de Krieg en el lóbulo temporal. A partir de sus características citoarquitectónicas se pueden distinguir tres zonas en su estructura: agranular, disgranular y granular, dependiendo de la menor o mayor presencia de neuronas granulares (capa cortical IV). La corteza insular en ratas comprende un área de aproximadamente 3 mm x 1 mm que corre por encima y a lo largo del surco rhinal, alrededor de la arteria cerebral media (Braun et al; 1982), se extiende dorsalmente hacia los bordes de las áreas somatosensoriales primaria y secundaria; posee un región anterior que es principalmente agranular y una región posterior con dos subregiones denominadas disgranular y granular. La corteza insular agranular se fusiona imperceptiblemente con la corteza perirhinal (Paxinos y Watson, 1995). Estudios electrofisiológicos mediante estimulación y evocación de señales de la lengua a la corteza gustativa, sugieren que en ratas los estímulos gustativos están confinados a la región agranular, aunque en primates se ha observado mayor correspondencia en la región granular y disgranular (Travers, 1993). Su interés no es sólo por su participación en el procesamiento de estímulos gustativos (Braun et al., 1982, Lasiter et al., 1982; Kiefer, 1985; Simon et al., 2006), sino porque diversos estudios han demostrado su participación en diversas tareas de aprendizaje, principalmente aquellas relacionadas con situaciones motivadas aversivamente (Dunn y Everitt, 1988; Escobar et al; 1989; Bermúdez-Rattoni y McGaugh, 1991; Bermúdez-Rattoni, 2004). Recientemente se demostró que la corteza insular granular participa en los circuitos motivacionales, al inactivarse esta región cerebral las ratas presentan un aumento en el requerimiento de anfetaminas y son incapaces de detectar el malestar gástrico inducido por el Cloruro de Litio (Contreras et al., 2007). Utilizando lesiones químicas en la corteza insular, se produce un severo déficit en el aprendizaje de la prevención pasiva, evidenciando un decremento significativo en la entrada al campo

oscuro y un incremento en la estancia dentro de éste (Bérmudez-Rattoni y McGaugh, 1991). Con lesiones reversibles de la corteza insular, utilizando tetrodotoxina, la cual bloquea los canales de sodio, se observó que la ejecución en el laberinto de agua de Morris se ve afectada (Bermúdez-Rattoni, 2004).

En la actualidad se cuenta con información precisa que describe cual es el recorrido anatómico que siguen los estímulos gustativos de la periferia hacia la neocorteza, basándose en estudios anatómicos, electrofisiológicos y conductuales. Todo comienza cuando un sabor es detectado por los receptores gustativos de la boca y transmitido hacia la porción anterior del núcleo del tracto solitario (NTS) en el tallo cerebral, vía los nervios craneales facial (VII) y glosofaríngeo (IX) principalmente y de manera secundaria por el vago (X). El segundo relevo del estímulo gustativo se ubica en el núcleo parabraqueal del puente, en lo que se ha denominado área gustativa del puente (Pontine Taste Area, en inglés PTA). Una vez aquí se reconocen dos rutas a seguir: en su mayoría las aferencias del PTA se dirigen a estructuras ventrales del cerebro basal, como son la amígdala, la zona lateral del hipotálamo y la sustancia innominata. La segunda ruta se dirige al complejo ventrobasal del tálamo, el cual se comunica con la corteza insular (Travers, 1993) [Fig. 6]. Lasiter et al., (1982) describen mediante el complejo de peroxidasa de rábano la existencia de proyecciones directas entre el PTA y la neocorteza, a la que les adjudican una función de discriminación fina de sabores. Es importante destacar que el primer relevo en este circuito (el NTS) recibe señales muy importantes provenientes de la rama hepática del vago así como de señales del área postrema y del sistema vestibular. Estas señales proveen información relacionada con irritación por intoxicación estomacal, sanguínea y sensaciones de náusea, respectivamente, las cuales llegan a la corteza insular, por lo cual se le ha denominado corteza visceral. Además se debe de considerar la conectividad recíproca y funcional de la CI con la amígdala, estructura cerebral vinculada estrechamente con la memoria aversiva (LeDoux, 1993; McGaugh et al; 1990), en particular con las proyecciones que recibe directamente del núcleo basolateral amigdalino (Krettek y

Price, 1974; Escobar et al., 1989; Bermúdez-Rattoni y McGaugh., 1991). A partir de esto ha sido posible considerar a la CI como una estructura fundamental en los procesamientos de integración y almacenaje de información gustativo-visceral, capaz de dirigir conductas motivadas por este tipo de información, como la evitación o aceptación de un alimento dependiente de una experiencia gustativa previa (Bermúdez-Rattoni, 2004; Simon et al., 2006).

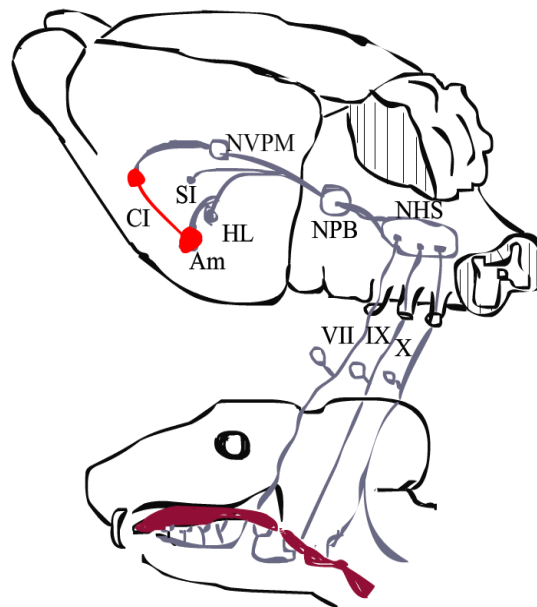


Figura 6. Esquema donde se muestra el sustrato anatómico de la vía gustativa en la rata. Abreviaturas: VII, nervio facial; IX, nervio glosofaríngeo; X, nervio vago; NHS, núcleo del haz solitario; NPB, núcleo parabrancial del puente; NVPM, núcleo ventroposteriomedial del tálamo; CI, corteza insular; SI, sustancia innominada; HL; hipotálamo lateral; Am, amígdala.

La amígdala y el CAS

La amígdala es una estructura constituida por un agregado neuronal de forma almendrada localizada en la región ventral del lóbulo temporal, entre la cápsula interna y el hipotálamo. La amígdala posee una estructura celular compleja donde ha sido posible distinguir de modo general dos masas nucleares: el grupo nuclear corticomedia, filogenéticamente antiguo, conformado por los núcleos medial, central y cortical; el núcleo corticobasal es una región filogenéticamente reciente constituida por núcleos basales y temporales (Bermúdez-Rattoni y Yamamoto, 1998). La amígdala ha

sido relacionada frecuentemente con las funciones emotivas más que con las cognitivas (LeDoux, 1993). Se ha observado que la estimulación de diferentes áreas de la amígdala se vincula a cambios en el sistema nervioso autónomo, en particular en cambios asociados con la expresión de miedo y ansiedad (Davis, 1994). Reacciones como el incremento en la presión sanguínea, dilatación pupilar y la salivación son mediadas por las proyecciones del núcleo central de la amígdala. Se ha considerado a la amígdala como un enlace entre estímulos y recompensas (Gaffan, 1992), como la base neuroanatómica de los cambios neuronales que subyacen a la memoria afectiva (Davis, 1992) o bien, como una estructura capaz de regular el almacenamiento de información en otras áreas cerebrales, siempre que sea activada por un estímulo emocional; esto es, la amígdala es capaz de fortalecer las memorias al relacionarlas con un significado emocional (McGaugh, 1990). Las lesiones en la amígdala han sido asociadas con efectos adversos en la realización de pruebas de aprendizaje como la prevención pasiva (McGaugh et al., 1995), la potenciación al reflejo del miedo (Falls et al., 1992) y la prevención activa (Bermúdez-Rattoni et al., 1997). La evidencia experimental ha logrado establecer un estrecho vínculo entre la amígdala y su participación en el CAS. Richardson (1973) observó que la estimulación de los núcleos basolateral o corticomediales de la amígdala produce inhibición en el consumo de alimentos. Lasiter (1982) demostró la presencia de proyecciones amígdalocorticales entre la neocorteza gustativa y los núcleos lateral y basolateral de la amígdala. En la actualidad es bien conocido que la amígdala recibe proyecciones directas del núcleo basolateral amigdalino (BLa) y que ambas estructuras contribuyen decisivamente a la formación y retención de la memoria asociada a sabores (Bermúdez-Rattoni et al., 1997; Bermúdez-Rattoni y McGaugh, 1991). Asimismo, se ha observado que al lesionar el BLa se altera la respuesta de aversión al sabor, mientras que las lesiones en el núcleo central de la amígdala no producen un efecto similar (Yamamoto et al., 1995). Esto sugiere una participación decisiva de la BLa en el CAS, lo cual se sustenta aún más si consideramos la interconectividad recíproca y funcional existente entre este núcleo y la CI (Escobar et al., 1989).

BDNF, LTP y CAS

En la actualidad, se tiene un conocimiento claro de las aferencias que recibe la CI, siendo de particular interés las provenientes del núcleo basolateral amigdalino (Bla) (Krettek y Price, 1974; Escobar et al., 1989; Bermúdez-Rattoni y McGaugh; 1991; Bermúdez-Rattoni et al., 1997). Por otra parte, la inducción de la LTP en la amígdala se encuentra bien documentada y de hecho existe una clara caracterización del circuito sináptico que participa durante el condicionamiento al miedo (Maren, 1996; Rogan et al., 1997). Ambas estructuras, la CI y la amígdala contribuyen a la formación y la retención de la memoria asociada al malestar gástrico (Bermúdez-Rattoni y MaGaugh, 1991; Bermúdez-Rattoni et al., 2004). Recientemente, Escobar et al., (1998) lograron inducir la LTP *in vivo* en la CI mediante la estimulación de alta frecuencia de las aferentes provenientes del Bla, el incremento en la respuesta sináptica de esta vía se conserva en un periodo de por lo menos una hora y su inducción puede ser bloqueada por la aplicación de antagonistas a los receptores glutamatérgicos de tipo NMDA como el CPP y el MK-801. Resultados similares fueron hallados por Jones et al., (1999). Recientes investigaciones demuestran que la inducción de LTP en la proyección (Bla-CI) previa al entrenamiento del CAS, aumenta la retención de esta tarea (Escobar et al., 2000), así como que el BDNF es capaz de inducir por sí solo LTP en la corteza insular, en ausencia de estimulación de alta frecuencia (Escobar et al., 2003). Lo anterior indica la participación del BDNF en las funciones mnémicas ejecutadas por esta región neocortical. Así el almacenamiento de información involucra cambios de corto y largo plazo en la comunicación sináptica, incluyendo alteraciones en las propiedades eléctricas y modificaciones estructurales. En virtud de que el BDNF se encuentra ampliamente involucrado en la modulación de ambas expresiones de plasticidad sináptica, y puesto que las cascadas metabólicas que se desencadenan tras su interacción con el receptor TrkB convergen en la modulación de la transcripción génica descrita, resulta evidente su participación en los procesos de aprendizaje y

memoria (McAllister et al., 1999; Tyler et al., 2002; Yamada et al., 2002). De hecho entre los patrones de señalización involucrados en la influencia que el BDNF ejerce sobre los citados procesos, destaca el patrón de señalización dependiente de MAPK a través de la activación de ERK (extracellular signal-regulated kinase) para incrementar la transmisión sináptica excitatoria in vivo, así como en algunas tareas de aprendizaje que involucran la integridad hipocampal (Messaoudi et al., 2002; Tyler et al., 2002; Ying et al., 2002; Igaz et al., 2006; Fischer et al., 2007). Investigaciones realizadas por Jones y colaboradores en 1999, señalan que la LTP neocortical origina la activación de ERK. Por otro lado se ha visto la activación de la una cascada metabólica dirigida por la proteína cinasa PI3K tras la unión BDNF/TrkB, se cree que esta cascada metabólica al igual que MAPK sostiene cambios plásticos que subyacen a procesos como la LTP y el aprendizaje y la memoria (Chen et al., 2005; Horwood et al., 2006; Ou y Gean; 2006; Yang et al., 2007;); se ha propuesto que ambas vías pueden converger en algún sitio (Atwal et al., 2000). De esta manera, la convergencia entre los patrones de señalización activados por BDNF/TrkB y por la estimulación capaz de inducir LTP, coadyuva a la comprensión de los mecanismos celulares que subyacen a los cambios en la eficiencia sináptica implicados en los procesos de aprendizaje y memoria.

Planteamiento del problema y justificación

Estudiar los procesos mnémicos a partir del estudio de los mecanismos celulares que los subyacen, nos brinda un acercamiento a la génesis del comportamiento del ser humano. De modo que el estudio de moléculas como las neurotrofinas implicadas en el fortalecimiento o modulación de la transmisión sináptica y la observación del papel que juegan dentro de la retención de un paradigma de aprendizaje, ofrece una valiosa herramienta para estudiar los eventos celulares que tienen lugar en áreas neocorticales para el almacenamiento de información.

En estudios previos se demostró que la estimulación tetánica de la amígdala basolateral induce LTP en la corteza insular de las ratas adultas, y que esta potenciación es dependiente de los receptores NMDA (Escobar et al, 1998a). Se observó asimismo que la administración intracortical de antagonistas de los receptores NMDA, deteriora la adquisición del CAS (Escobar, et al 1998b). Más tarde, se demostró que la inducción de LTP en la proyección de la amígdala basolateral (BLa) a la corteza insular (CI), previa al entrenamiento del condicionamiento aversivo a los sabores aumenta la retención de esta tarea (Escobar et al., 2000). En recientes investigaciones se ha mostrado que la administración intracortical de BDNF a la corteza insular, produce un incremento en la eficiencia sináptica en el patrón de comunicación del núcleo basolateral amigdalino a la corteza insular, similar al obtenido tras la estimulación tetánica en esta área (Escobar et al., 2003). Como parte de nuestras investigaciones (Castillo et al., 2006, ANEXO 1) observamos que la infusión de BDNF en la CI incrementa la retención del CAS. Aunado a lo anterior, se ha observado que ciertas tareas conductuales modifican la eficiencia sináptica de manera similar a las modificaciones inducidas por la LTP, como una expresión de plasticidad homeostática (Monfils y Teskey, 2004; Rioult-Pedotti et al., 2000; Quinlan et al., 2004; Ziemann et al., 2004).

Objetivos generales

Considerando que el BDNF es capaz de inducir un fenómeno similar a la LTP y que la administración intracortical de BDNF produce un incremento en la retención del CAS, la presente investigación examinó los mecanismos celulares involucrados en las acciones del BDNF sobre la retención del CAS. Tomando en cuenta que la inducción de la LTP en la CI incrementa la retención del CAS, en el presente proyecto se examinó la interacción del entrenamiento en el condicionamiento aversivo a los sabores con la subsecuente inducción de la LTP, como una expresión de plasticidad homeostática en un área neocortical.

Objetivos particulares

1. Caracterizar parte de los mecanismos involucrados en las acciones del BDNF sobre la retención del condicionamiento aversivo a los sabores, utilizando inhibidores de las proteínas cinasas MAPK y PI3K.
2. Analizar la influencia del entrenamiento en el CAS sobre la subsecuente inducción de la LTP en la vía de comunicación que va del núcleo basolateral amigdalino a la corteza insular de ratas adultas *in vivo*.

Procedimiento experimental

Sujetos

Para las fases experimentales I y II de la presente investigación se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con pesos de 350-380 g, que se mantuvieron en cajas individuales de acrílico, y estuvieron bajo un ciclo de luz-oscuridad 12h/12h a una temperatura promedio de 23°C; con comida y agua *ad libitum* (excepto en las fases experimentales que especifiquen lo contrario).

Implantación de cánulas

El procesamiento quirúrgico de los sujetos se llevó a cabo utilizando procedimientos estereotáxicos convencionales y consistió en la implantación bilateral de guías cánulas de acero inoxidable de 1 cm de longitud y 0.022 pulgadas de calibre. Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital (50 mg/kg i.p.) Las coordenadas empleadas fueron AP=+1.2 mm; ML=+5.5 mm; DV=-2 mm (Paxinos et al., 1995). Los extremos de las guías cánula fueron colocadas 5 mm arriba de la CI bilateralmente; fueron fijadas al cráneo usando acrílico dental de secado rápido. Un estilete de acero inoxidable se colocó al interior de las cánulas con el fin de proteger su luz de obstrucciones con material orgánico durante el periodo de recuperación y entrenamiento. Los grupos canulados fueron infundidos intraparenquimalmente en la región correspondiente a la CI en ausencia de anestésicos. Tras una semana de recuperación post-cirugía se procedió a administrar las moléculas en cuestión (inhibidores para MAPK y PI3K), 24 horas previas al inicio del Entrenamiento del CAS. Para todos los grupos, las microinyecciones fueron administradas por microinyectores consistentes en agujas dantales de calibre 30. El microinyector fue introducido en la cánula previa remoción del estilete y se extendió 5 mm por debajo del extremo inferior de la cánula, alcanzando así la región correspondiente a la CI. Los microinyectores fueron conectados mediante tubos de polietileno a jeringas Hamilton de 10 µl. Las microinyecciones fueron dosificadas mediante una bomba de microinfusión (Carnegie Medicin, MA) a una velocidad de flujo de 1 µl/1 minuto. Una vez inyectado el volumen total de la solución vehículo con fármaco, de acuerdo al protocolo experimental los microinyectores permanecieron durante un minuto más para asegurar la adecuada difusión de la solución en el tejido [Fig. 7].

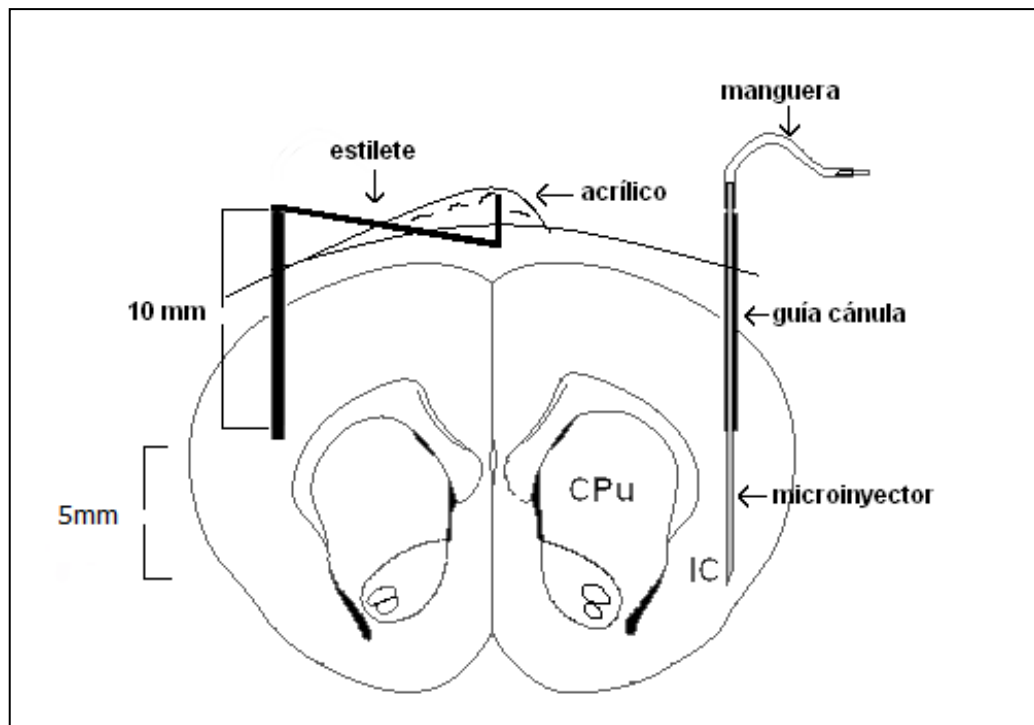


Figura 7. Esquema de un corte coronal que señala la posición de las guías cánulas utilizadas para la infusión de los fármacos en la corteza insular. CI = corteza insular, Cpu = Caudado-Putamen.

Condicionamiento aversivo a los sabores

Tras una semana de recuperación post-cirugía se procedió a administrar los fármacos, 24 horas previas al inicio del entrenamiento en el CAS. Para iniciar los animales fueron privados de agua por 24 horas. Posteriormente se les entrenó para beber agua dos veces al día (10 y 18 horas) durante 10 minutos por cada sesión de entrenamiento en un periodo de cuatro días durante los cuales se

estableció la línea base de consumo. Los bebederos fueron contruidos con probetas graduadas cubiertas con tapones de caucho horadados con boquillas de metal. El día de la adquisición los animales fueron privados de alimento y se sustituyó el agua por un sabor novedoso solución de sacarina al (0.1%; Sigma, WI). Después de 10 minutos se administró una dosis intraperitoneal (i.p) de cloruro de litio (0.2 M; 9.37 ml/Kg) para inducir el malestar digestivo. El consumo de la línea base fue sustituida nuevamente por la solución de sacarina 0.1% durante la prueba de aversión. La disminución del consumo de sacarina con respecto a la ingesta de agua durante la última línea base fue usada como parámetro de la fuerza aversiva del CAS. Para analizar la posible participación del BDNF en la retención del CAS, que es el primer objetivo de nuestra investigación, se llevaron a cabo nueve sesiones de extinción para todos los grupos. Para llevar a cabo el segundo objetivo de nuestra investigación se programaron las sesiones de adquisición del estímulo aversivo de cada rata con 24 horas de diferencias entre ellas para poder realizar la fase electrofisiológica correspondiente a 48, 72, 96, y 120 horas después de la prueba de aversión.

Electrofisiología

Tras 48, 72, 96 y 120 horas concluida la fase conductual (CAS), los cuatro grupos CAS+LTP y los cuatro grupos pseudosCAS+LTP fueron sometidos a la fase electrofisiológica. El grupo LTP fue introducido a la fase electrofisiológica sin previo entrenamiento en el CAS. Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital (50 mg/kg i.p.), posteriormente se administraron inyecciones suplementarias del anestésico a intervalos de una hora con el fin de mantener los niveles quirúrgicos de anestesia. La temperatura del cuerpo fue mantenida a 35°C con un cojín homeotérmico. Las respuestas de la corteza insular fueron registradas unilateralmente con un electrodo monopolar de acero de 127 micrómetros de diámetro, colocado en las coordenadas de la corteza insular: AP +1.2 mm, ML +5.5 mm, DV -5.5 mm (Paxinos y Watson, 1995). La respuestas fueron evocadas unilateralmente a través de estimulación directa en el núcleo basolateral amigdalino, en las coordenadas: AP -2.8 mm, ML -5.0 mm, 8.5 mm ó -0.2 mm (Paxinos y Watson, 1995), con un electrodo bipolar trenzado de acero de 127 micrómetros. La estimulación (pulsos monofásicos de 20-40 μ A y 0.1-0.25 mseg de duración) fue administrada por un estimulador Grass S48. Las respuestas evocadas fueron registradas con una unidad de aislamiento (PSIU6), la cual envía la señal a un amplificador Grass P5. Posteriormente la señal fue

digitalizada para su almacenamiento y análisis en una computadora que contenía el software "Date Wave". Estímulos de baja frecuencia fueron evocados cada 20 segundos durante los 20 minutos que constituyen la línea base. Las señales electroencefalográficas fueron monitoreadas en todo momento del registro. Posterior a la línea base, se aplicaron 10 trenes de estimulación con duración de un segundo a una frecuencia de 100 Hz, con un intervalo intertrén de 20 segundos, con el fin de inducir la LTP. Tras la estimulación de alta frecuencia, las respuestas evocadas fueron registradas durante una hora más, con el fin de observar los cambios en la pendiente de los PPSE's.

Inmunohistoquímica

Los animales fueron sacrificados mediante una sobredosis de anestésico pentobarbita a diferentes ventanas de tiempo, posteriores a la infusión de BDNF. La perfusión se efectuó transcárdialmente con 100 ml de PBS 0.1 M (pH 7.4) seguido por 400 ml de paraformaldehído al 4%/glutaraldehído 0.2% en fosfato buffer 0.1M (pH 7.4). El periodo de exposición a los fijadores durante la perfusión fue de 30 min, seguido por un periodo post-fijación de 24 hr a 4 °C. Los cerebros fueron entonces transferidos a una solución de sucrosa al 30% en PBS 0.1 M (pH 7.6). Secciones coronales de 40 µm fueron colectadas en buffer de fosfatos, e incubados 3 días en el anticuerpo primario, anti-BDNF, (1:500; alomone) ó anti-Phospho CREB (1:500; upstate) a 4° C. Para revelar el anticuerpo se utilizó el método de inmunoperoxidasa-complejo a vitina-biotina, brevemente, las secciones fueron lavadas en PBS-T e incubadas por 2 hr en el anticuerpo secundario (1: 200; Vectastain ABC Elite Kit), lavadas nuevamente e incubadas 2 hr en el complejo a vitina-biotina-peroxidasa. La marca de peroxidasa fue revelada por la reacción con diaminobenzidina (DAB) en 50mM de Tris, pH 7.6/0.01% H_2O_2 [0.6 ml DAB (10mg/ml) 30 ml PBS 0.1M y 5 µl de H_2O_2]. Por último se lavaron tres veces en una solución de PBS al 0.3% Tritón X-100 por 20 min en cada ocasión. La reacción inmunohistoquímica fue desarrollada usando un equipo Vectastain ABC Elite. Finalmente las secciones fueron montadas en portaobjetos en cristal bañados en gelatina y cromoalúmina, y fueron analizadas al microscopio.

Histoquímica de Nissl

Una vez concluida la fase conductual y electrofisiológica del experimento, los animales fueron sacrificados mediante una sobredosis del anestésico pentobarbital. Se procedió a la perfusión intracardial de los sujetos canulados con solución salina al 9% seguida por una segunda perfusión con solución fijadora de paraformaldeído 4% / glutaraldeído 0.1% en PBS pH 7.4. Los cerebros fueron extraídos y almacenados para su postfijación en paraformaldeído 4% / glutaraldeído 0.1% durante 24 horas a 4°C. Transcurrido este periodo, fueron almacenados en una solución de sacarosa al 30% en PBS hasta que alcancen una densidad mayor a la de la solución. Solo entonces los cerebros fueron congelados y rebanados en cortes coronales de 40 μm . Las muestras fueron teñidas con violeta de cresilo y examinadas en un microscopio de luz, con el fin de verificar que la posición de la punta del microinyector y el microelectrodo. Los cortes se montaron en portaobjetos de cristal bañados de gelatina y cromoalúmina.

Análisis de datos.- Para el análisis de los datos resultantes de los experimentos electrofisiológicos así como del curso temporal de la curva de extinción se empleó el ANOVA de medidas repetidas. En ambos casos se utilizó la prueba post-hoc de Fisher.

Descripción de las fases experimentales

Fase I

Con el fin de analizar parte de los mecanismos involucrados en las acciones del BDNF sobre la retención del condicionamiento aversivo los sabores utilizamos inhibidores para MAPK y PI3K, los grupos fueron divididos de la siguiente forma:

- ◆ BDNF (n=9), al que se administró BDNF (3 μg /3 μl bilateralmente) (Alomone Labs. Jerusalem).

- ◆ Grupo LY294002+BDNF (n=6), al que se administró el inhibidor para la proteína cinasa PI3K (LY294002, 1µl bilateralmente) (Alomone Labs. Jerusalem), 25 minutos más tarde se administró una infusión de BDNF (3µg/3µl bilateralmente).
- ◆ Grupo U0126+BDNF (n=6), al que se administró el inhibidor para la cascada de proteínas cinasas MAPK (U0126, 1µl bilateralmente) (Alomone Labs. Jerusalem), 25 minutos más tarde se administró BDNF (3µg/3µl bilateralmente).
- ◆ Grupo PD98059+BDNF (n=7), al que se administró el inhibidor para la cascada de proteínas cinasas MAPK PD98059 (1µl bilateralmente) (Alomone Labs. Jerusalem), 25 minutos más tarde administró una infusión de BDNF (3µg/3µl bilateralmente).
- ◆ CONTROL intacto (n=9), al que sólo se sometió a la fase conductual sin ninguna manipulación previa.

Todas las administraciones se efectuaron en la corteza insular a una velocidad de microinfusion de 1µl/1 minuto.

Diagrama de flujo correspondiente a la fase I

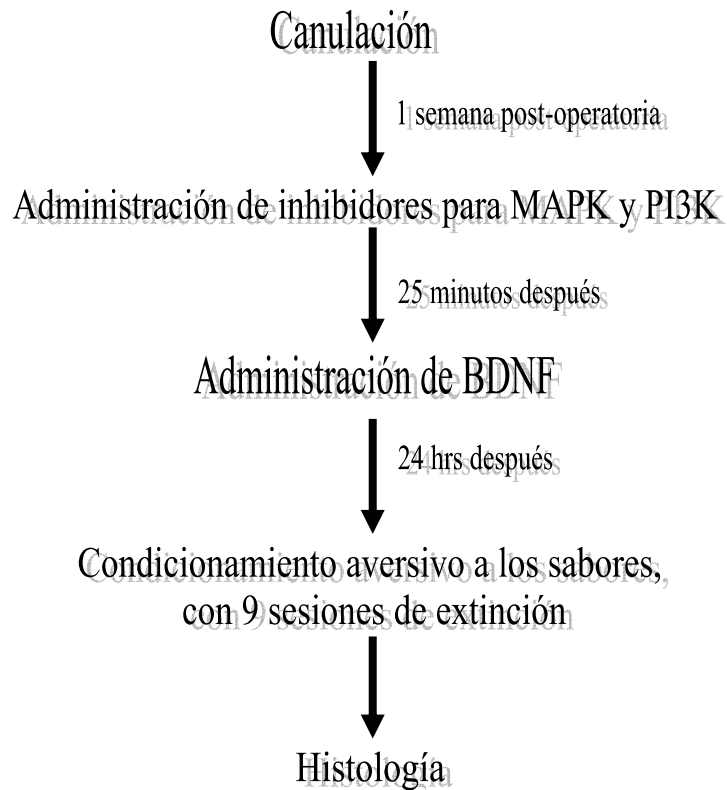


Diagrama de flujo sobre el procedimiento experimental de la fase I. Con el fin de analizar parte de los mecanismos involucrados en las acciones del BDNF sobre la retención del condicionamiento aversivo a los sabores, se llevó a cabo una sesión de canulación en los grupos experimentales: BDNF, LY294002+BDNF, U0126+BDNF y PD98059+BDNF, como se reporta en el procedimiento experimental. Una semana después se realizó la administración de los fármacos correspondientes y 25 minutos más tarde se administró BDNF, 24 horas posteriores a la infusión de las sustancias se llevó a cabo el entrenamiento en el condicionamiento aversivo a los sabores que constó de 9 pruebas de aversión.

Fase II

Con el fin de analizar la influencia del entrenamiento en el CAS sobre la subsecuente inducción de la LTP en la vía de comunicación BLA-CI, los grupos fueron divididos de la siguiente forma:

- ◆ Grupos CAS+LTP, los cuales fueron entrenados en el CAS (con inyección i.p. de LiCl) 48, 72, 96 Y 120 horas previas a la inducción de LTP en la corteza insular: grupo CAS+LTP48 (n=4), CAS+LTP72 (n=4), CAS+LTP96 (n=4) y CAS+LTP120 (n=5).
- ◆ Grupos pseudoCAS+LTP, a los cuales se les entrenó es en CAS (en ausencia del estímulo aversivo, con inyección i.p. de PBS): grupo pseudoCAS+LTP48 (n=4), pseudoCAS+LTP72 (n=6), pseudoCAS+LTP96 (n=5) y pseudoCAS+LTP (n=5).
- ◆ Grupo LTP (n=5) que fue sometido directamente a la fase electrofisiológica.

Diagrama de flujo de la fase II

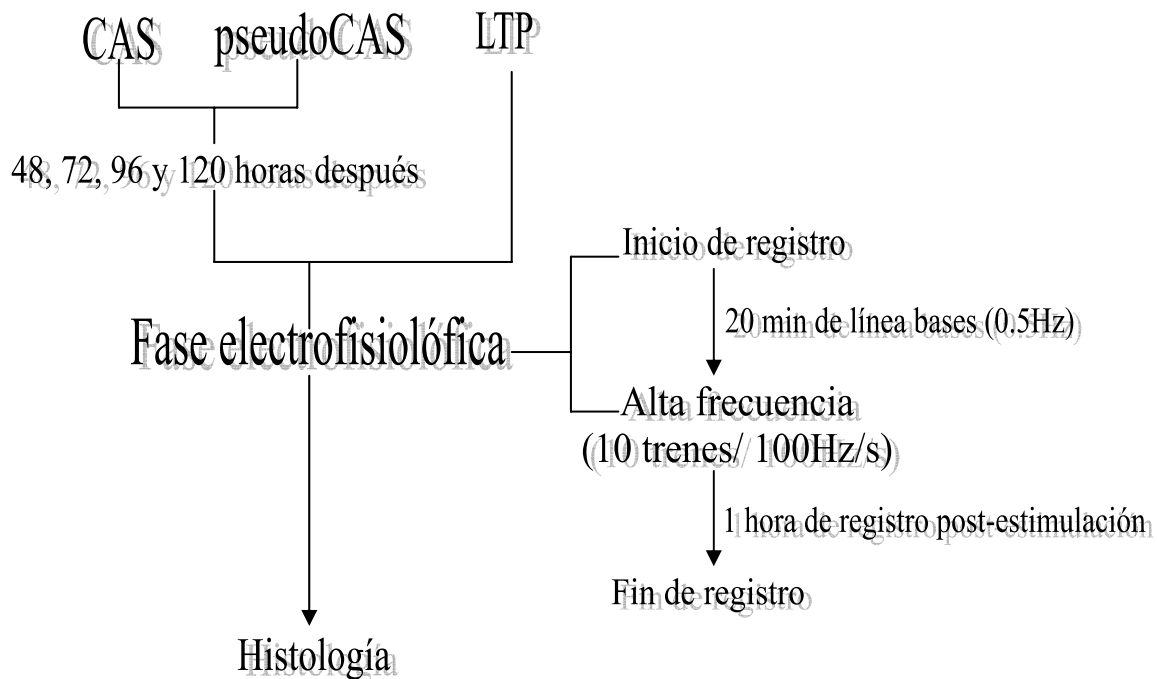


Diagrama de flujo del procedimiento experimental de la fase II.

Con el objetivo de analizar la influencia del entrenamiento en el CAS sobre la subsecuente inducción de la LTP en la vía de comunicación BLA-CI de ratas adultas *in vivo*. Se llevó a cabo el entrenamiento en el CAS a los grupos correspondientes, los grupos pseudoCAS no recibieron el estímulo aversivo. 48, 72, 96 y 120 horas posteriores al entrenamiento de la tarea, los sujetos fueron sometidos al registro electrofisiológico. El grupo LTP fue introducido directamente al registro electrofisiológico. Finalmente se llevaron a cabo los estudios histológicos con el fin de observar la adecuada posición de los microelectrodos.

Resultados

Resultados farmacológicos y conductuales de la fase I

No existieron diferencias significativas entre los grupos durante el consumo basal de agua (línea base) ni durante el consumo de la solución de sacarina durante la sesión de adquisición del CAS (ver gráfica 1). Por el contrario se observaron diferencias significativas entre los grupos durante la retención de la prueba, como se aprecia en la gráfica 2 durante las sesiones de extinción. El ANOVA de medidas repetidas reveló diferencias significativas entre los grupos $F(4, 32) = 8.81, p < 0.0001$. El análisis post-hoc empleando la prueba de Fisher mostró que el grupo BDNF presentó un incremento significativo en la retención de la tarea, como lo indica el decremento en el consumo de sacarina, cuando se compara con los grupos restantes durante la tercera, cuarta, quinta ($p < 0.0001$) y sexta pruebas de extinción ($p < 0.0001$).

El ANOVA factorial para cada una de las sesiones de extinción revela lo siguiente:

Para la tercera prueba de extinción se puede apreciar una diferencia altamente significativa ($**p = 0.0001$) en el consumo de la solución de sacarina entre los grupos BDNF con respecto a los demás grupos (ver gráfica 4).

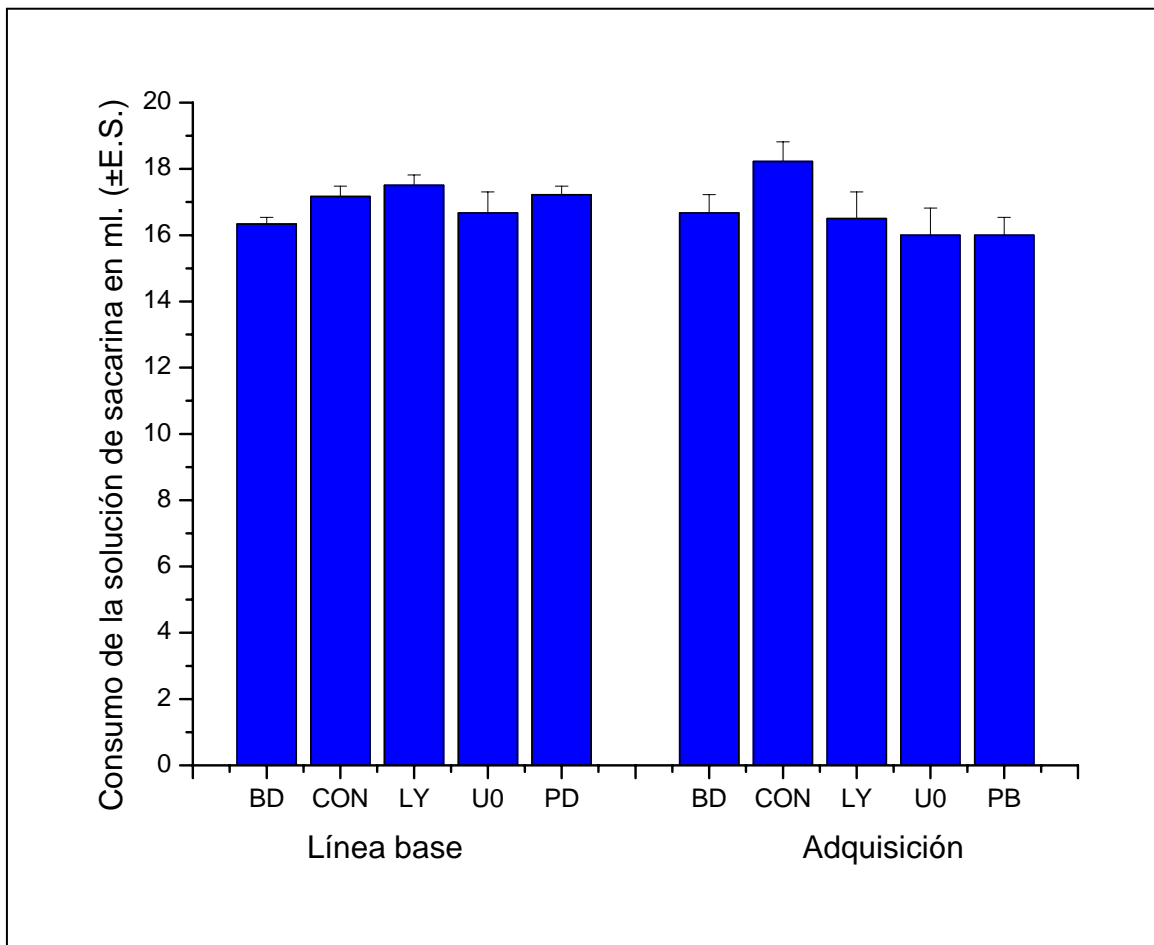
Hacia la cuarta sesión de extinción se puede observar que existe una diferencia nuevamente altamente significativa ($**p = 0.0001$) entre los grupos BDNF con los grupos restantes (ver gráfica 5).

Por otra parte, estas diferencias altamente significativas ($**p = 0.0001$) se observan en la quinta sesión de extinción entre el grupo BDNF con respecto a los demás grupos (ver gráfica 6).

Por su parte en la sexta sesión de extinción se observa nuevamente que existe una diferencia altamente significativa ($**p = 0.0001$) entre los grupos BDNF con respecto a los demás grupos, mientras el grupo CON, LY294002+BDNF, PD98059+BDNF y U0126+BDNF comienzan a alcanzar su nivel basal (ver gráfica 7).

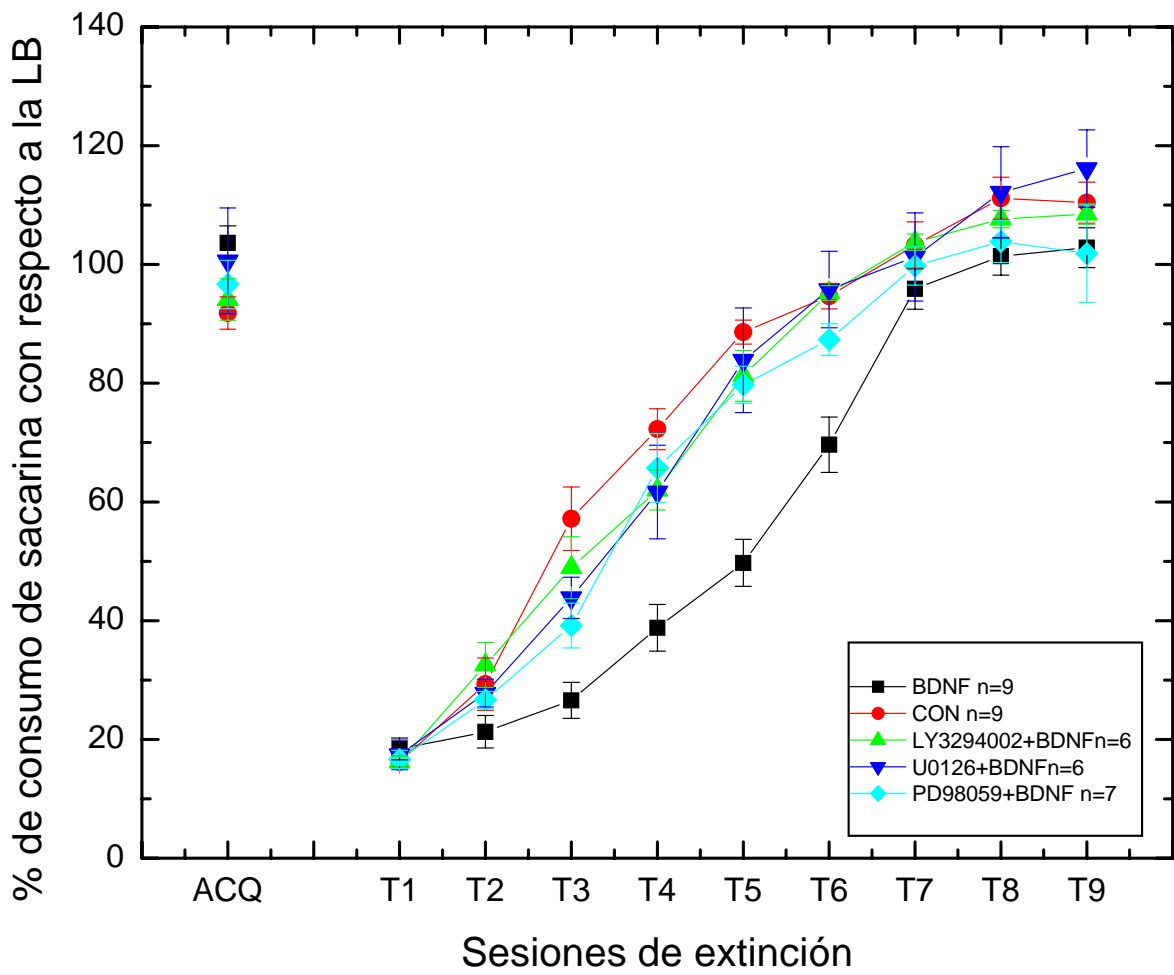
Finalmente hacia la séptima, octava y novena sesión de extinción no se revelan diferencias significativas de los grupos entre sí (ver gráficas 8, 9 y 10).

Consumo de la solución de sacarina durante la línea base y la sesión de adquisición



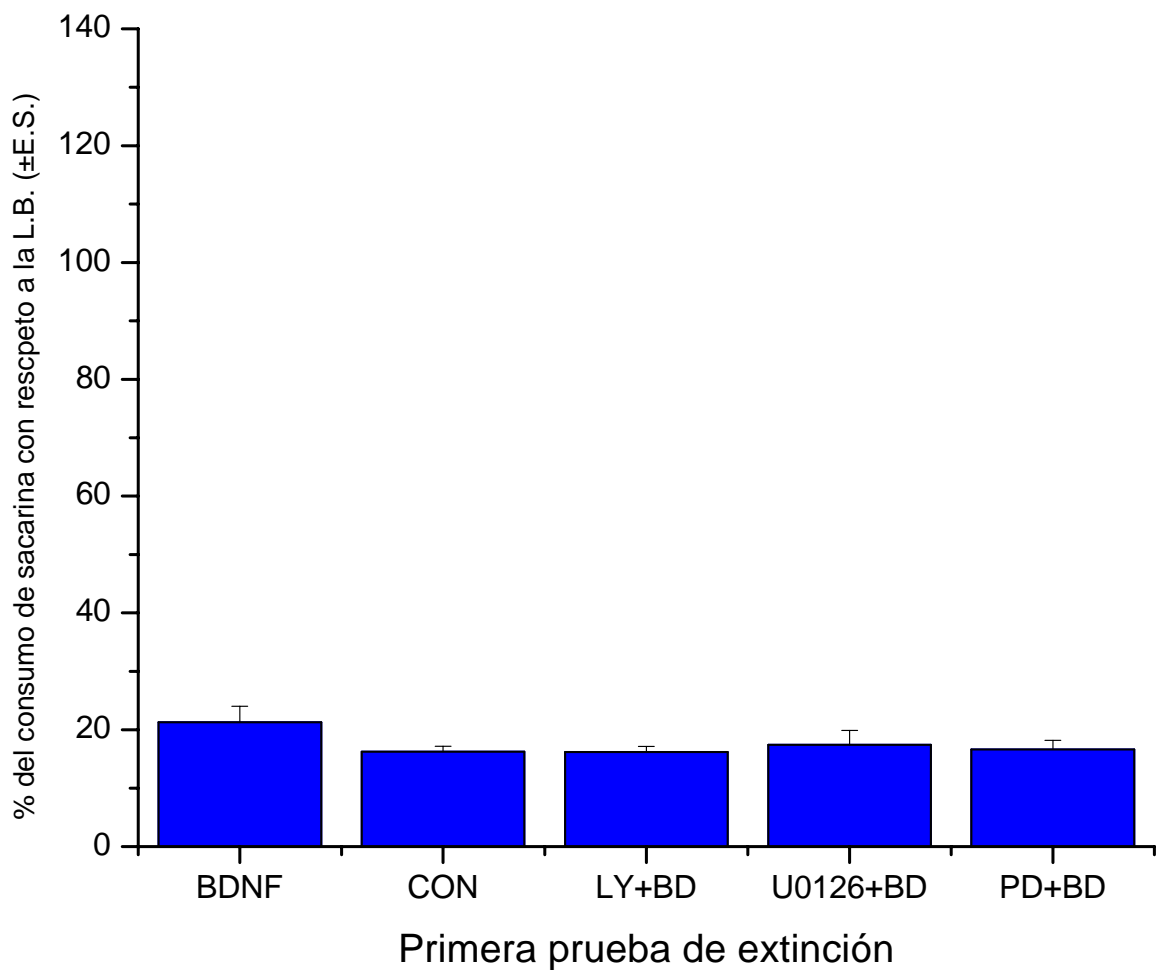
Gráfica 1. Gráfica comparativa de todos los grupos en el consumo de sacarina durante la línea base y la adquisición. No se muestran diferencias significativas entre los grupos.

Consumo de la solución de sacarina durante las nueve sesiones de extinción en el CAS.



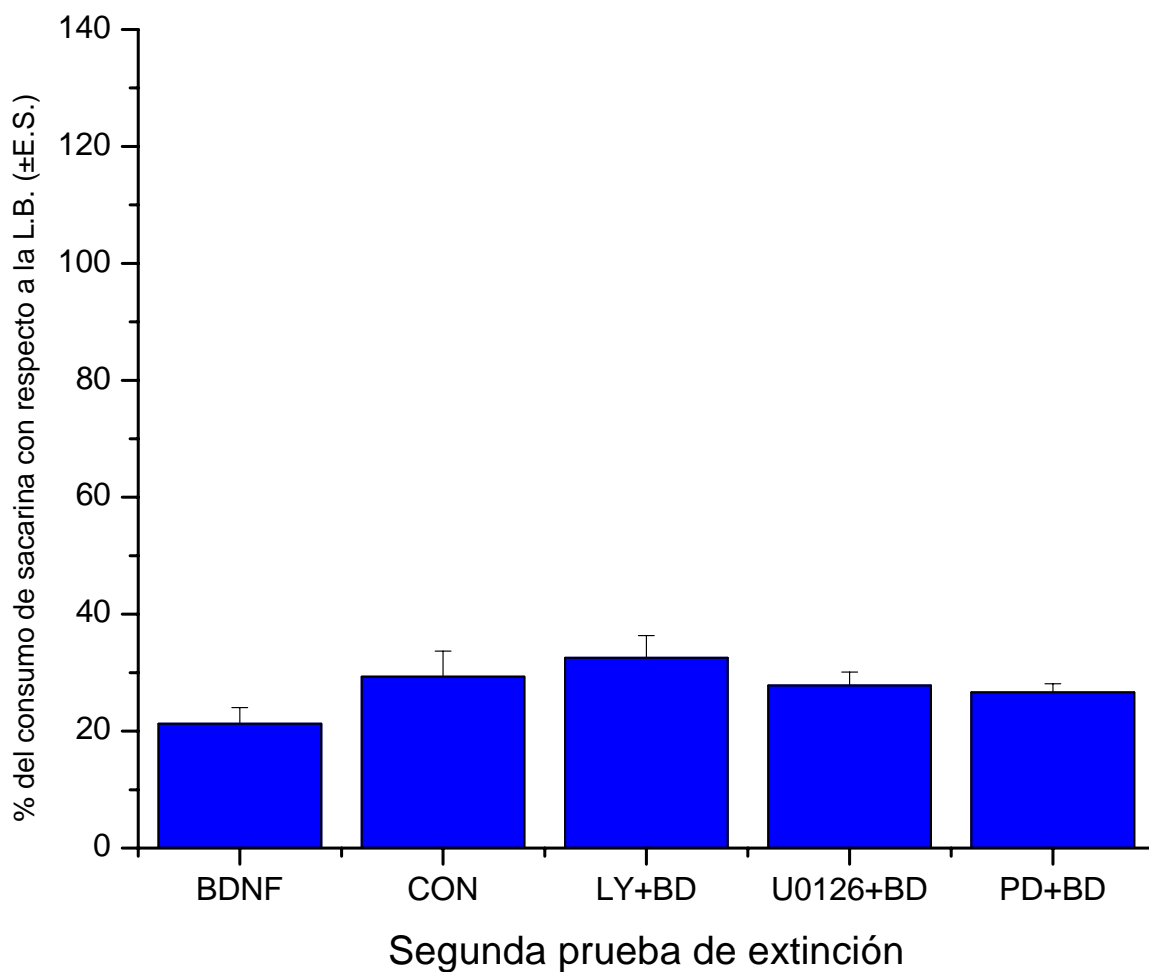
Gráfica 2. Participación de las proteínas cinasas PI3K y MAPK en los efectos del BDNF sobre la retención del CAS.

Consumo de la solución de sacarina durante la primera prueba de extinción.



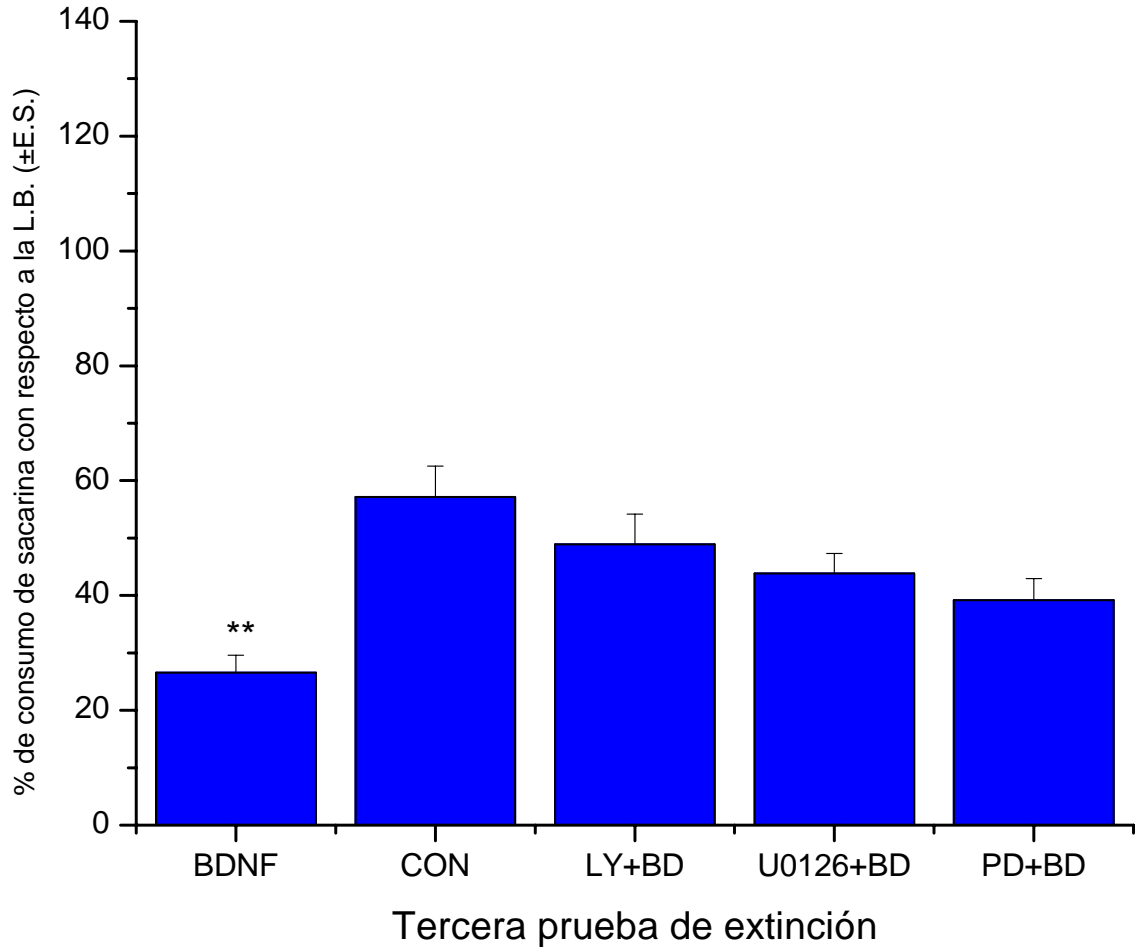
Gráfica 3. Efectos de la infusión de BDNF previa al entrenamiento del CAS, durante la primera sesión de extinción. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

Consumo de la solución de sacarina durante la segunda prueba de extinción



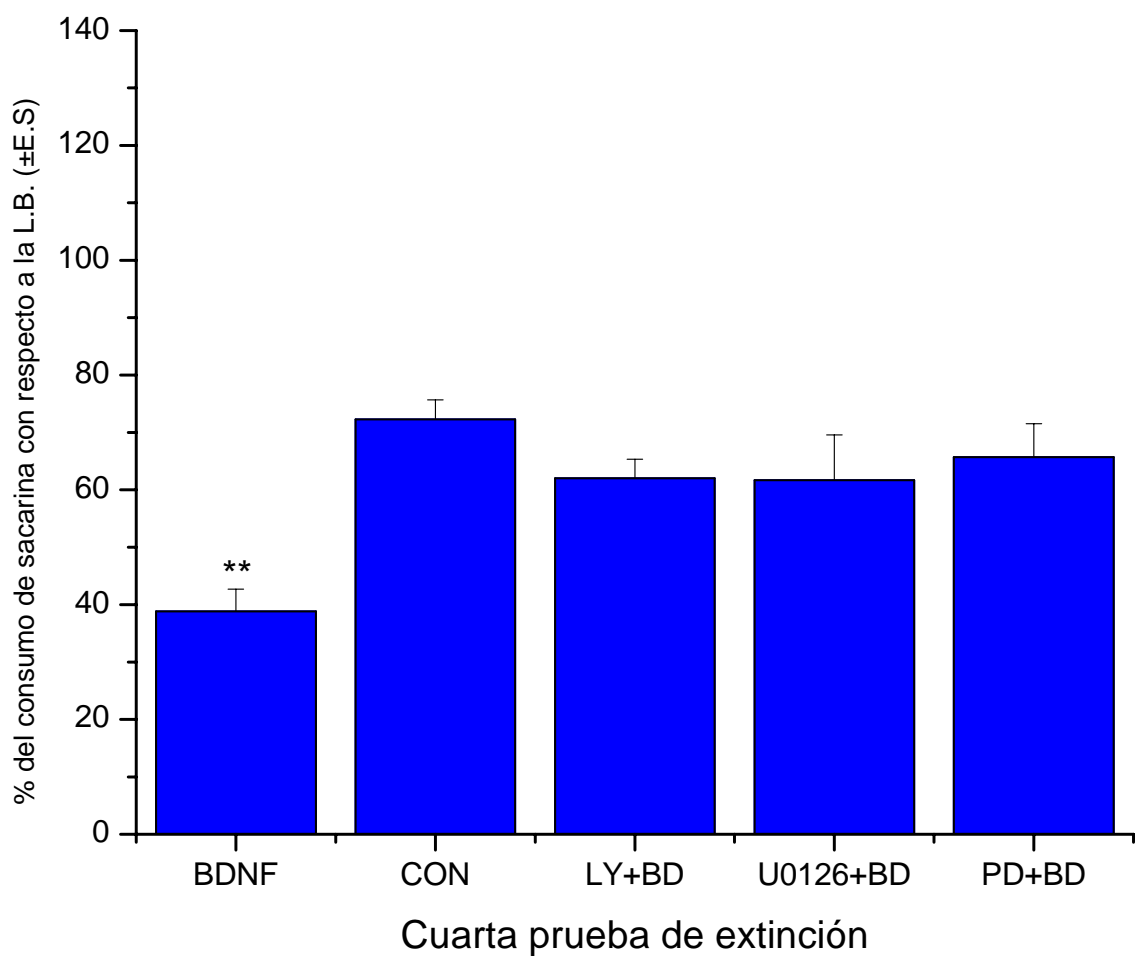
Gráfica 4. Efectos de la infusión de BDNF previa al entrenamiento del CAS, durante la segunda sesión de extinción. No se encontraron diferencias significativas en el consumo de la solución de sacarina.

Consumo de la solución de sacarina durante la tercera prueba de extinción



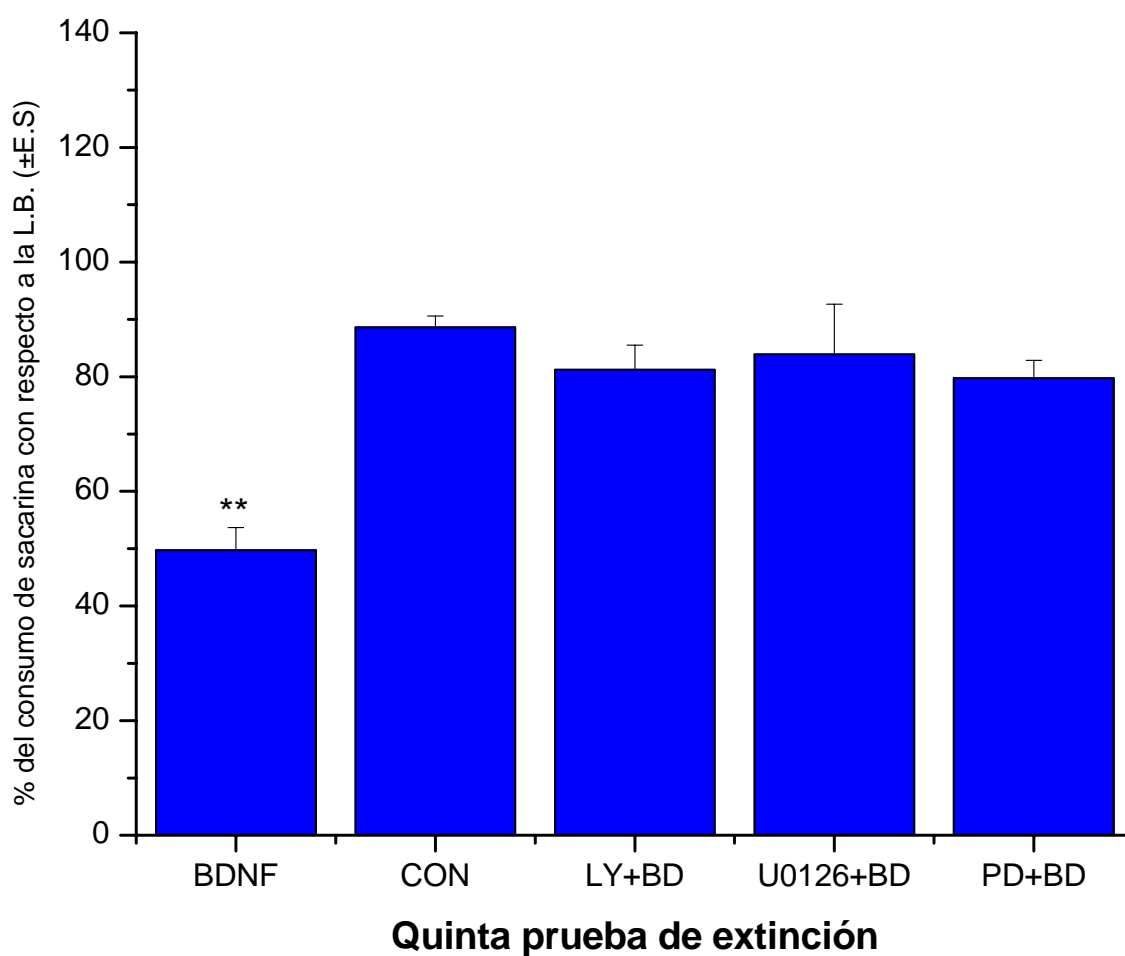
Gráfica 5. Efectos de la infusión de BDNF previa al entrenamiento del CAS, durante la tercera prueba de extinción. Los animales recibieron una infusión intracortical de BDNF o los inhibidores para (MAPK y PI3K) previas a la adquisición del CAS. Se observa que el grupo BDNF presenta un decremento significativo en el consumo de sacarina durante la tercera prueba de extinción (** $p < 0.0001$).

Consumo de la solución de sacarina durante la cuarta prueba de extinción



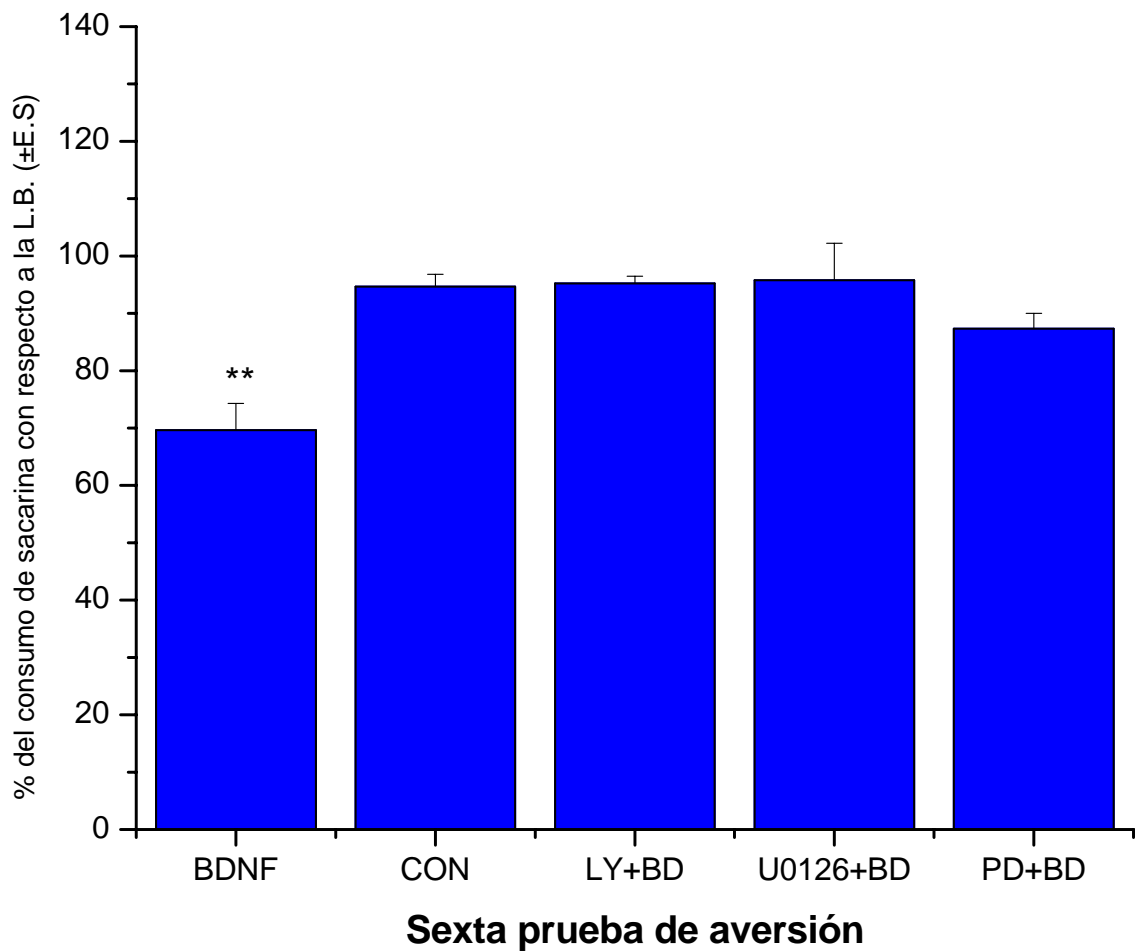
Gráfica 6. Efectos de la infusión de BDNF previa al entrenamiento del CAS, durante la cuarta prueba de extinción. Se observa en la cuarta prueba de extinción que el grupo BDNF presenta diferencias significativas en el consumo de sacarina en comparación con los otros grupos (** $p < 0.0001$).

Consumo de la solución de sacarina durante la quinta prueba de extinción



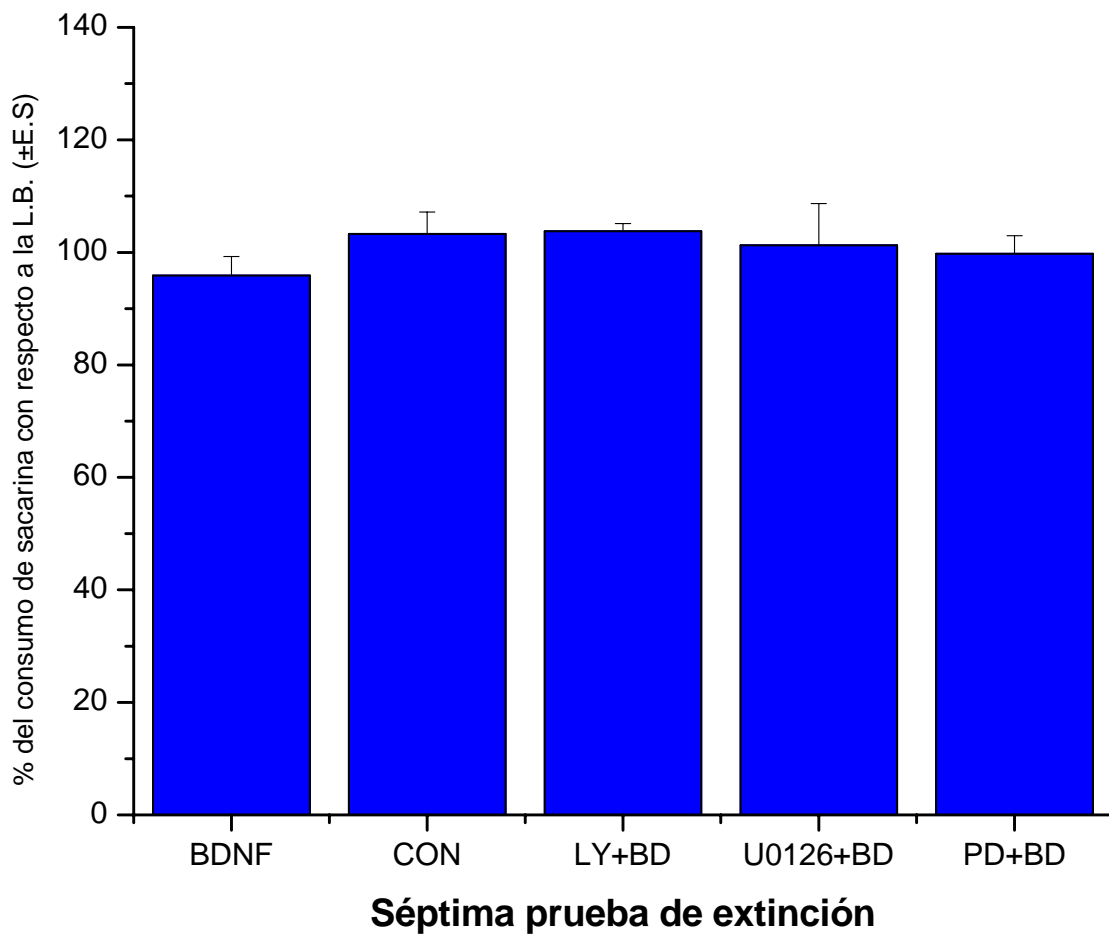
Gráfica 7. Efectos de la infusión de BDNF previa al entrenamiento del CAS durante la quinta prueba de extinción. Se continúa observando una diferencia altamente significativa del consumo basal de sacarina entre el grupo BDNF con los grupos restantes (** $p < 0.0001$). Mientras que los grupos CON, LY+BD, U016+BD y PD+BD han incrementado su nivel de consumo, sin mostrar diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

Consumo de la solución de sacarina durante la sexta sesión de extinción



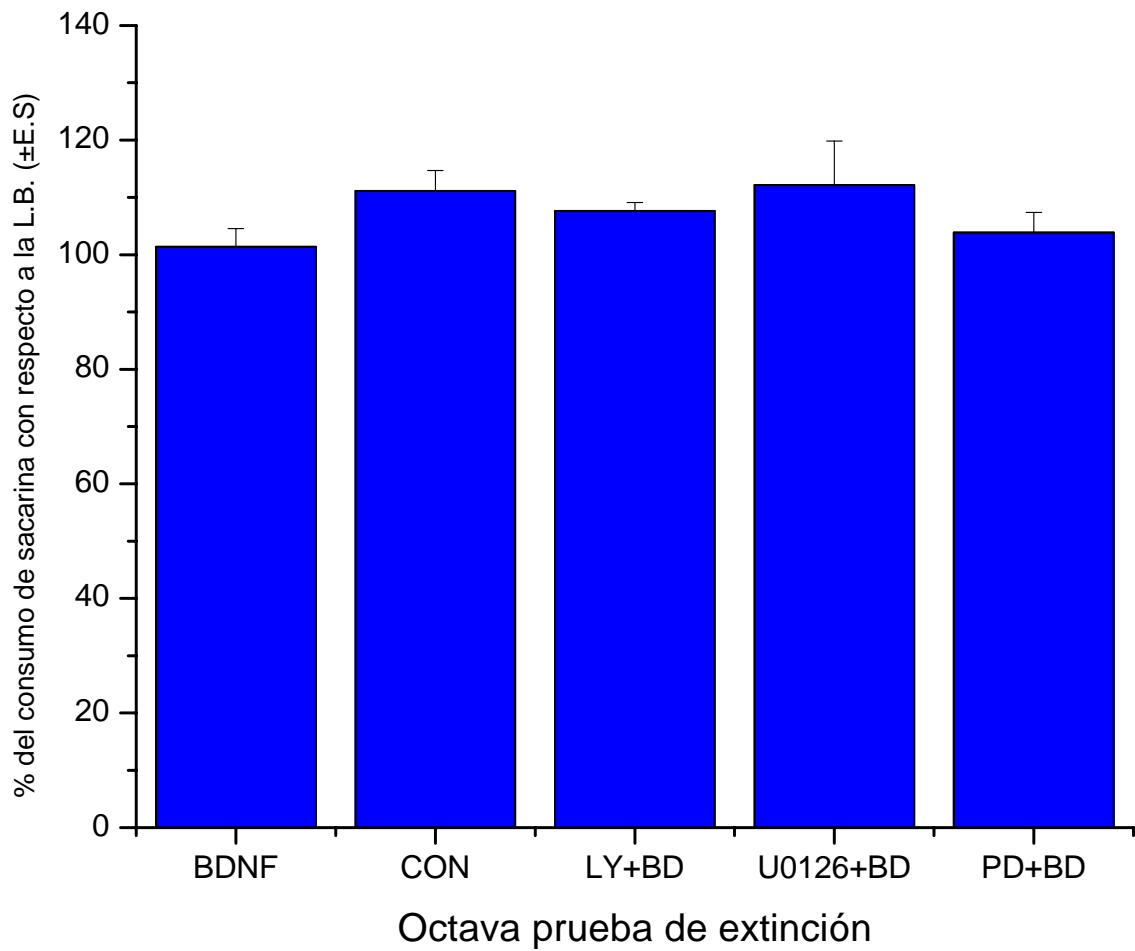
Gráfica 8. Efectos de la infusión de BDNF previa al entrenamiento del CAS, durante la sexta prueba de extinción. La diferencia de consumo porcentual continúa siendo significativa para el grupo BDNF en comparación con los otros grupos (** $p < 0.0001$). Esto indica la permanencia del incremento en la retención del estímulo aversivo en el grupo infundido con BDNF. Asimismo los animales infundidos con BDNF y los inhibidores para MAPK y PI3K no presentan el mismo efecto que el grupo BDNF.

Consumo de la solución de sacarina durante la séptima prueba de extinción



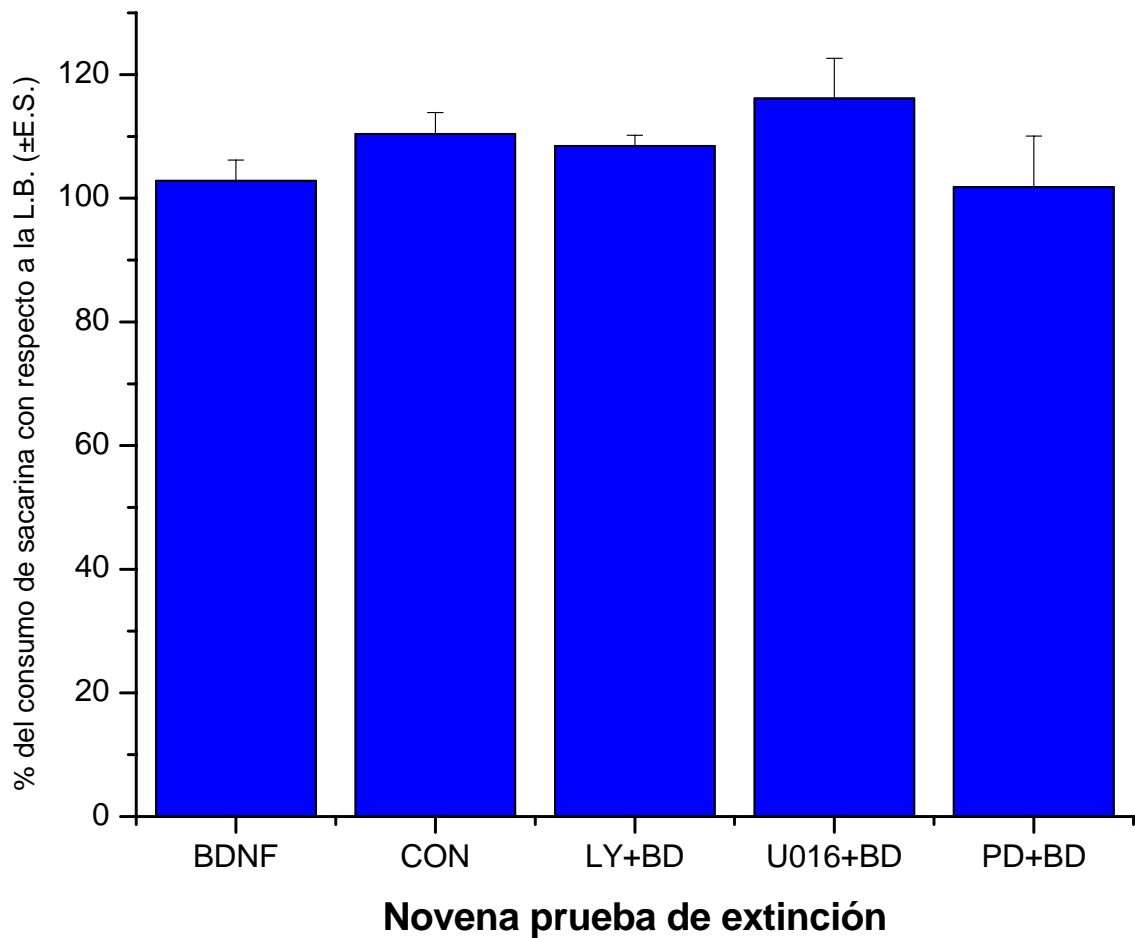
Gráfica 9. Efectos de la infusión de BDNF previa al entrenamiento del CAS, durante la séptima prueba de extinción. No se observaron diferencias significativas en el consumo de sacarina durante la séptima prueba de extinción. Los grupos CON, LY+BD, U016+BD y PD+BD han alcanzado su línea base de consumo.

Consumo de la solución de sacarina durante la octava prueba de extinción



Gráfica 10. Efectos de la infusión de BDNF previa al entrenamiento del CAS, durante la octava prueba de extinción. No se observaron diferencias significativas en el consumo de sacarina durante la séptima prueba de extinción entre los grupos.

Consumo de la solución de sacarina durante la novena prueba de extinción



Gráfica 10. Efectos de la infusión de BDNF previa al entrenamiento del CAS, durante la séptima prueba de extinción. No se observaron diferencias significativas en el consumo de sacarina durante la novena prueba de extinción para ningún grupo. En esta fase todos han alcanzado su nivel de consumo de solución sacarina basal.

Resultados histológicos

Con el fin de observar la difusión que tiene el BDNF en la corteza insular, realizamos estudios de inmunocitoquímica, llevados a cabo como se explica en el procedimiento experimental. Se observó que la difusión de la neurotrofina alcanza a abarcar cerca de 3 mm³. Asimismo observamos que la proteína se remueve una hora más tarde de la infusión de la neurotrofina (Catillo et al., 2006; Messaoudi et al., 2002), la imagen muestra la presencia de BDNF 15 minutos después de la infusión y una hora más tarde [Fig. 8].

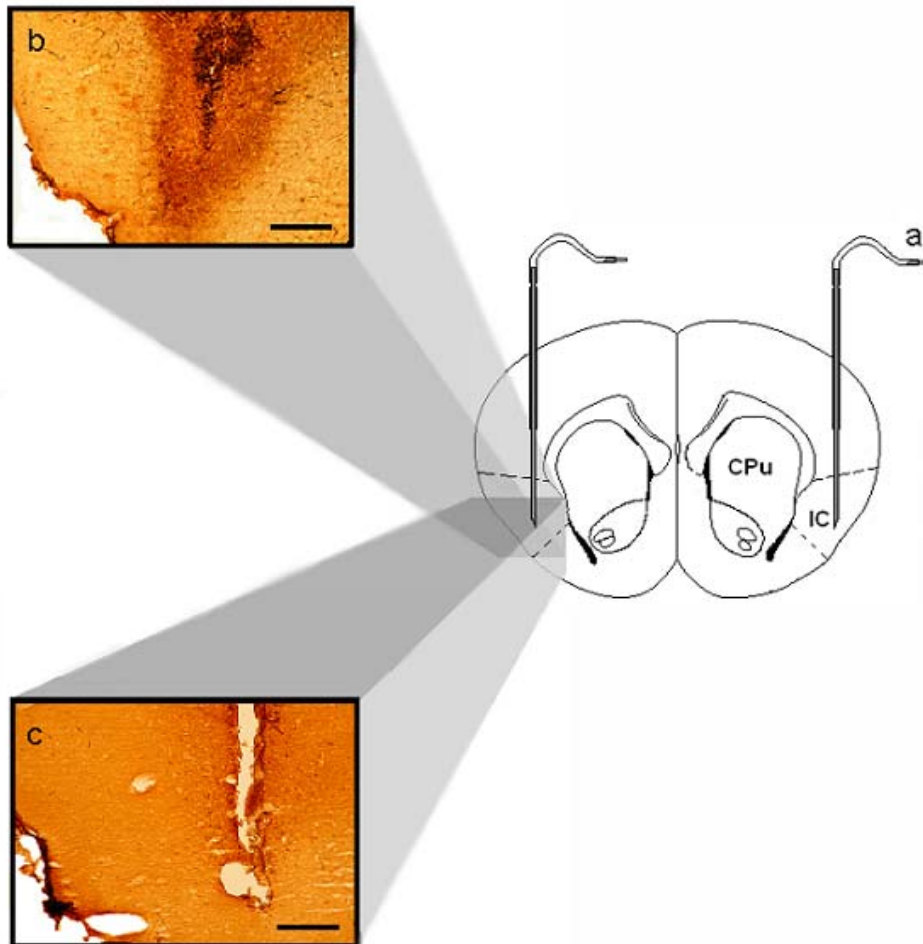


Fig. 8. Distribución del BDNF en la corteza insular. (a) Representación esquemática de las guías cánulas y la ubicación del microinyector, las líneas discontinuas muestran los límites del área de la corteza insular. (b,c) inmunocitoquímica del BDNF obtenida 15 min y 1 hr después de la infusión de la neurotrofina, respectivamente. Escala de barra: 1mm.

Por otra parte, con el fin de analizar la activación del factor de transcripción CREB tras la infusión de BDNF, efectuamos ensayos inmunohistoquímicos para CREB fosforilado (P-CREB), en análisis efectuados 15 y 30 minutos, así como, 3, 6, 9 y 12 horas posteriores a la administración de BDNF. [Fig. 9].

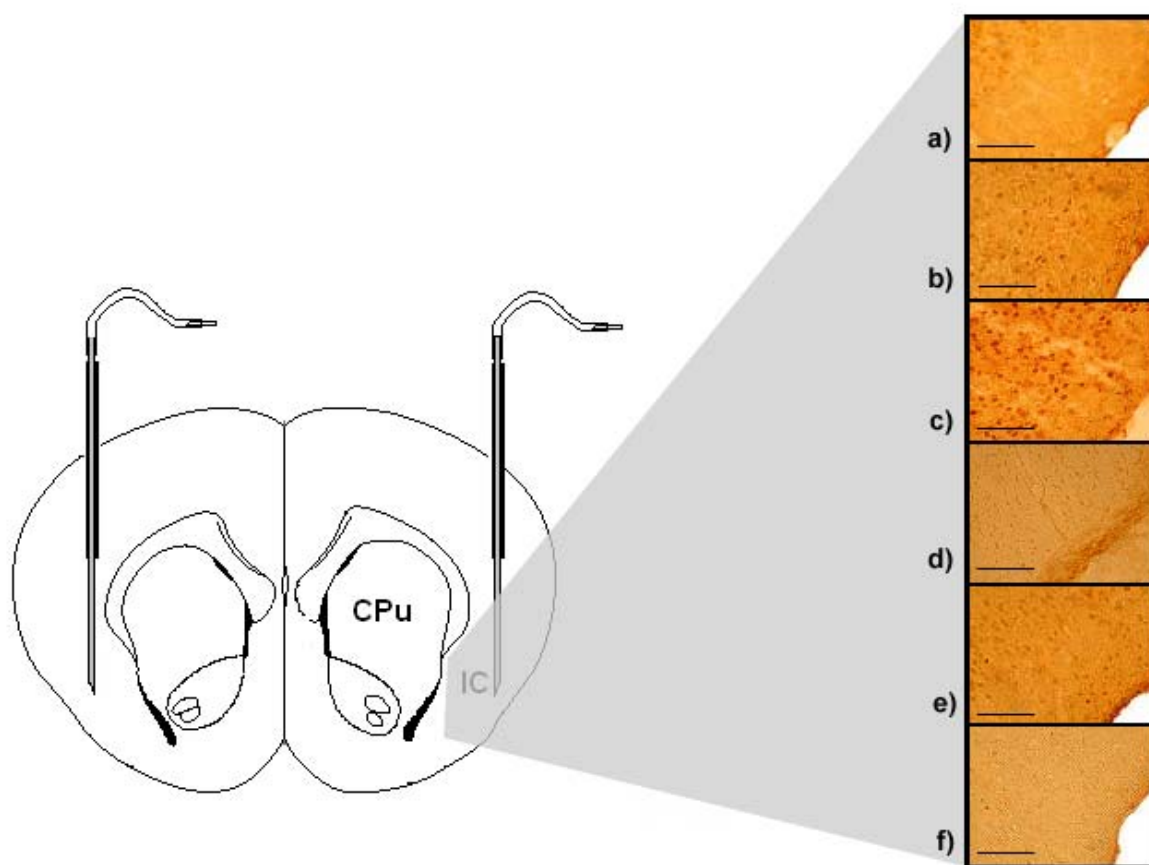


Fig. 9. Esquema de un corte coronal que muestra los bordes de la corteza insular. Inmunocitoquímica para CREB fosforilado a) 15 min, b) 30 min, c) 3 hr, d) 6 hr, e) 9 hr y f) 12 hr, posteriores a la infusión de BDNF. Escala de barra: 1mm.

Nuestros resultados muestran que CREB se encuentra fosforilado hacia los 15 y 30 minutos posteriores a la infusión de BDNF, dicha

fosforilación permanece 3 horas más tarde y declina hacia las 6 horas, incrementa nuevamente a las 9 horas y hacia las 12 horas disminuye.

Resultados conductuales y electrofisiológicos de la fase II

No existieron diferencias significativas entre los grupos durante el consumo basal de agua (línea base) ni durante el consumo de la solución de sacarina durante la sesión de adquisición del CAS. Por el contrario, se observaron diferencias significativas entre los grupos CAS+LTP y pseudoCAS+LTP en la prueba de aversión al sabor [Fig. 11].

La ANOVA factorial reveló diferencias significativas entre los grupos ($F_{(8,33)} = 229.60$, $p < 0.0001$). Asimismo el análisis post hoc empleando la prueba de Fisher mostró que el consumo en la prueba de aversión de los grupos CAS+LTP presentó diferencias significativas ($p < .0001$) con respecto a las sesiones de adquisición y prueba de aversión del grupo pseudoCAS+LTP.

En este estudio como anteriormente se ha reportado (Escobar et al., 1998 a), se muestra que diez trenes de estimulación con duración de un segundo cada uno a una frecuencia de 100 Hz, induce LTP en la vía recomunicación que va del núcleo basolateral amigdalino hacia la corteza insular en ratas adultas *in vivo*.

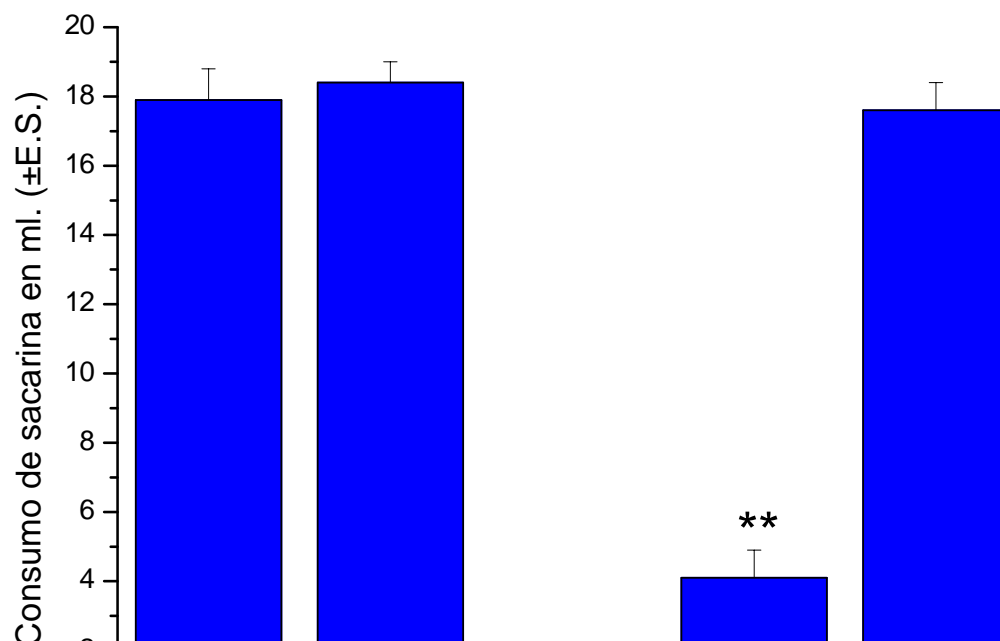
La respuesta característica de esta señal, la cual fue inducida por los pulsos monofásicos de 20-40 μA y 0.1-0.25 ms de duración, inició de 2 a 3 ms y presentó su valle de los 7 a 9 ms aproximadamente. La amplitud promedio de estos potenciales de campo fue de 0.32 ± 0.01 mV, con una pendiente de 0.075 ± 0.002 .

En los grupos pseudoCAS+LTP y LTP se observó un incremento significativo en los PPSEs con respecto a la línea base, tomada 20 minutos antes de la inducción de los trenes [Gráficas 12-16]. Este incremento fue de $35.24 \pm 2.69\%$, de $35.35 \pm 10.74\%$, de $27.22 \pm 6.38\%$ y de $39.20 \pm 5.96\%$, respectivamente para los grupos pseudoCAS+LTP 48, 72, 96 y 120. Mientras que para el grupo LTP, el incremento fue de $38.10 \pm 7.81\%$, es decir, se indujo potenciación a

largo plazo en respuesta a la estimulación de alta frecuencia en todos los grupos mencionados. Mientras tanto en el grupo CAS+LTP el cambio de los PPSEs con respecto a la línea base fue de: $4.68 \pm 2.24\%$ para el grupo CAS+LTP48, $3.69 \pm 2.54\%$ para el grupo CAS+LTP72, $2.98 \pm 3.32\%$ para el grupo CAS+LTP96 y $1.66 \pm 2.38\%$ para el grupo CAS+LTP120, lo cual indica que no fue posible inducir potenciación de largo plazo en dichos grupos, después de la aplicación de los trenes de alta frecuencia [Gráficas 12-15].

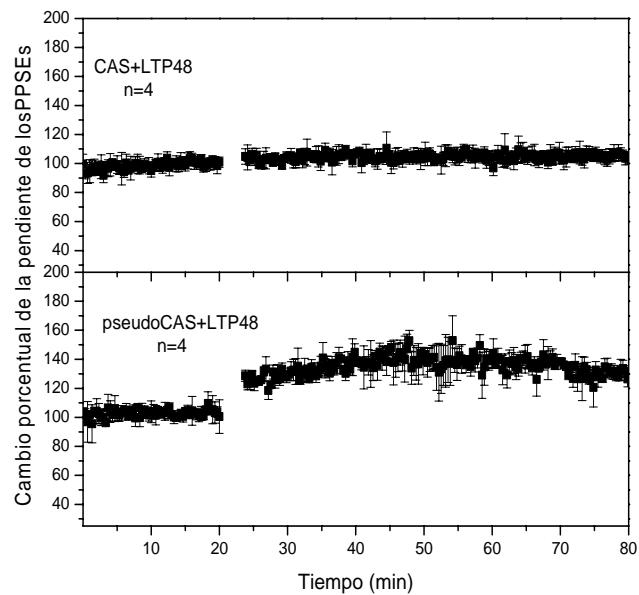
En el análisis estadístico, se comparó la pendiente de los PPSEs medidos después de la inducción de los trenes de alta frecuencia de todos los grupos. Estos grupos mostraron diferencias significativas cuando se utilizó el ANOVA de medidas repetidas ($F = (8,33), 27.067$ $p < 0.0001$). El análisis post-hoc empleando la prueba de Fisher mostró que los grupos pseudoCAS+LTP48, 72, 96 y 120, no mostraron diferencias significativas entre ellos. Sin embargo, todos y cada uno de los grupos mencionados anteriormente presentaron diferencias significativas ($p < 0.0001$) con respecto a los grupos CAS+LTP48, 72, 96 y 120, sin presentar diferencias significativas entre ellos. Estas interacciones nos indican que los grupo CAS+LTP, los cuales no presentaron la LTP en respuesta a la estimulación de alta frecuencia, presentan diferencias significativas con respecto a los grupos pseudoCAS+LTP, que sí presentaron el fenómeno, lo cual muestra que el entrenamiento en el CAS inhibe la subsecuente inducción de LTP en la CI. Estos datos también nos indican que no existen diferencias significativas entre las distintas ventanas de tiempo de los grupos CAS+LTP, lo cuál muestra que el efecto producido por el CAS sobre la subsecuente posibilidad de inducir LTP en la CI, es persistente en el tiempo.

Consumo de solución de sacarina durante la sesión de adquisición



Gráfica 11. Gráfica comparativa de las sesiones de adquisición y prueba de aversión al sabor. Se observan diferencias significativas entre los grupos CAS+LTP y el grupo pseudoCAS+LTP. No hay diferencias entre los grupos durante la sesión de adquisición.

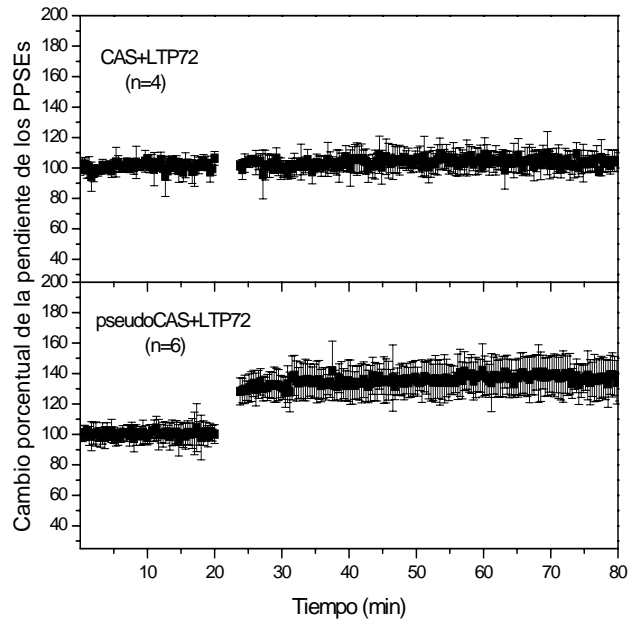
48 horas



Gráfica 12. Inducción de LTP 48 hrs después del entrenamiento en el CAS. En esta gráfica se muestra que el grupo CAS+LTP 48 horas después del entrenamiento en el CAS no

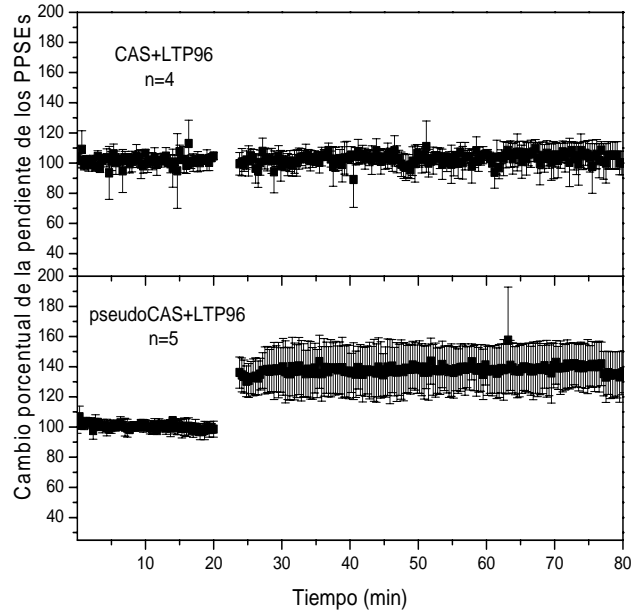
muestra un incremento en los PPSEs en la proyección BLa-CI, posterior a la estimulación de alta frecuencia, en comparación el grupo pseudoCAS+LTP presenta una LTP tras la estimulación tetática.

72 horas



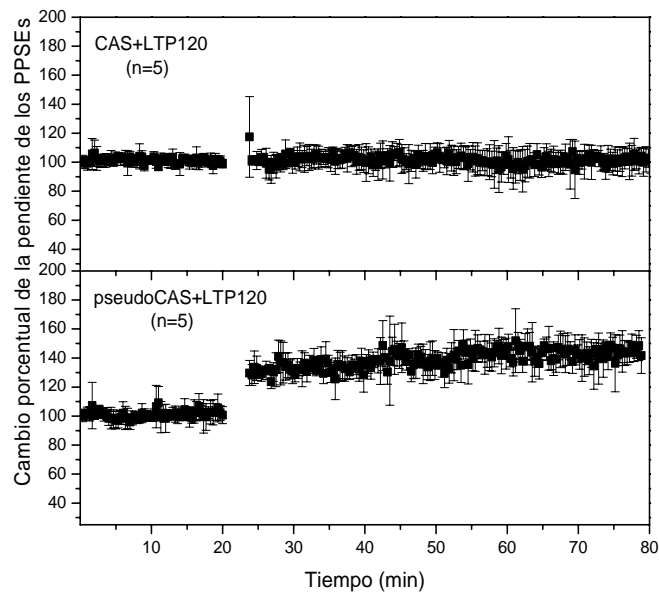
Gráfica 13. Inducción de LTP 72 hrs después del entrenamiento en el CAS. Se observa que en el grupo CAS+LTP no es posible inducir LTP tras la estimulación de alta frecuencia, 72 horas después al entrenamiento en el CAS, mientras que el grupo pseudoCAS+LTP presenta una LTP después de la aplicación de alta frecuencia.

96 horas



Gráfica 14. Inducción de LTP 96 hrs después del entrenamiento en el CAS. La incapacidad de inducir LTP en la proyección BLA-CI persiste 96 horas posteriores al entrenamiento en el CAS, como lo muestra la gráfica, el grupo CAS+LTP96 no presenta LTP después de recibir estimulación tetánica, en comparación con el grupo pseudoCAS+LTP que muestra un incremento significativo de la eficacia sináptica.

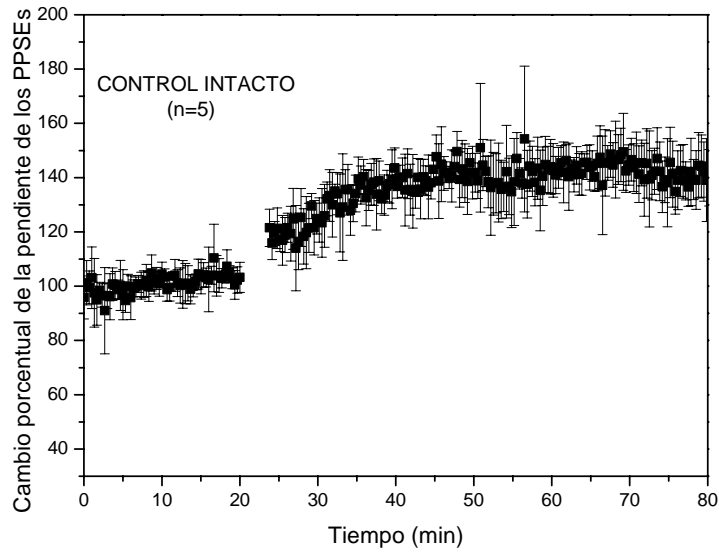
120 horas



Gráfica 15. Inducción de LTP 120 hrs después del entrenamiento en el CAS. 120 horas posteriores al entrenamiento en el CAS persiste el fenómeno metaplástico. La

proyección BLA-CI no puede ser potenciada tras inducir estimulación de alta frecuencia en dicha vía. El grupo pseudoCAS+LTP muestra una LTP normal a la inducida por estimulación de alta frecuencia.

LTP



Gráfica 16. Grupo LTP. Se observa que tras estimular con alta frecuencia la vía que del I núcleo basolateral amigdalino-corteza insular en ratas sin alguna manipulación conductual se induce una potenciación de largo plazo en dicha vía.

Discusión

FASE I

BDNF en el aprendizaje y la memoria

La memoria involucra cambios a corto plazo en las propiedades eléctricas y alteraciones estructurales a largo plazo en la sinapsis. El BDNF modula ambas expresiones de plasticidad sináptica, lo que sugiere que juega un papel importante en el aprendizaje y la memoria (Soulé et al., 2006; Bramham, 2007; Gómez-Palacio y Escobar, 2007; Bekinschtein et al., 2007). El presente estudio muestra que la infusión aguda de BDNF en la corteza insular aumenta la retención de la tarea del CAS, mientras que los animales a los que se administraron inhibidores para las cascadas de MAPK y PI3K muestran un comportamiento similar al de los grupos control, esto indica la participación de las cascadas de MAPK y PI3K en los efectos del BDNF sobre la retención del CAS. Lo anterior concuerda con estudios en los que la participación del BDNF es fundamental para el almacenamiento de información en el sistema nervioso central (Ma et al., 1998, Mu et al., 1999; Kessler et al., 2003; Mizuno et al., 2003; Cirulli et al., 2004; Alonso et al., 2005; Heldt et al., 2007 y Bekinschtein et al., 2007). Asimismo nuestros resultados concuerdan con estudios en los que se demuestra la participación de las cascadas metabólicas MAPK y PI3K durante el almacenamiento de algunas tareas (Lin et al., 2001; Shalin et al., 2004; Sweatt, 2004; Chen et al., 2005; Igaz et al., 2006; Horwood et al., 2006; Hugues et al., 2006; Ou y Gean, 2006; Fischer et al., 2007; Satoh et al., 2007). Nuestros resultados muestran la participación del BDNF en los mecanismos que subyacen al almacenamiento de información llevado a cabo por la corteza insular. En este orden de ideas, estudios recientes muestran que la administración de anticuerpos para BDNF provoca deterioro en el aprendizaje de una tarea espacial (Mu et al., 1999). De manera similar se ha observado que ratones carentes del gen que codifica al BDNF muestran déficit en el paradigma de

evitación pasiva (Minichiello et al., 1999). En un estudio reciente Kesslak et al., (2003) muestran que la disminución de ARNm para BDNF afecta la adquisición de una tarea que involucra aprendizaje espacial. En el presente estudio se observó que la presencia de la proteína es requerida para prolongar la retención del CAS en concordancia con estudios en los que el BDNF endógeno es requerido para la formación de la memoria de corto y largo plazo en una tarea aversiva (Johnston and Rose, 2001; Cirulli et al., 2004; Alonso et al., 2005; Heldt et al., 2007 y Bekinschtein et al., 2007). Conductualmente se han demostrado incrementos en la expresión de ARNm para BDNF y su receptor TrkB en diferentes tareas de aprendizaje (Kesslak et al., 1998; Ma et al., 1998, Mizuno et al., 2000; Ishibashi et al., 2002; Pollak et al., 2005; Chen et al., 2007; Niamark et al., 2007; Silhol et al., 2007). En concordancia con nuestros estudios Kopone et al. (2004) mostraron que la sobreexpresión de TrkB en la corteza e hipocampo de ratones incrementa la retención del CAS en comparación con el grupo control. Otra investigación demostró que carencia del receptor TrkB en la amígdala de ratas impide la consolidación de la extinción del paradigma conocido como evitación pasiva (Chhatwal et al., 2006). Por otro lado Heldt et al. (2007) observaron que ratones mutados del gen que codifica a BDNF tienen déficit en la ejecución de las tareas de reconocimiento de objetos y de memoria espacial, mientras que en el condicionamiento al miedo no hay algún efecto sobre la adquisición, sin embargo se observa una reducción significativa en la consolidación de la extinción de dicha tarea. Estudios recientes demostraron que las infusiones de BDNF producen dramáticos incrementos en la eficacia sináptica de larga duración que se asemejan al fenómeno de la LTP en rebanadas o cultivos hipocampales (Sherwood y Lo, 1999; Gooney y Lynch, 2001), en la corteza visual (Akaneya et al., 1997; Carmignoto et al., 1997; Ying et al., 2002) y recientemente en la corteza insular (Escobar, 2003). Escobar et al., (2000) demostraron que la inducción de LTP en la proyección (Blá-CI) previa al entrenamiento del CAS, aumenta la retención de esta tarea, lo cual se asemeja a los hallazgos del presente trabajo considerando la convergencia de los mecanismos celulares desencadenados por la LTP

inducida tanto por estimulación eléctrica, como por infusión de BDNF. Así el presente estudio enfatiza la participación del BDNF como mediador molecular no solo de la plasticidad sináptica sino también de la interacción entre un organismo y su medio ambiente (Tyler et al., 2002).

Mecanismos moleculares del BDNF en la corteza insular

Los estudios que se han realizado acerca de los mecanismos moleculares que se desencadenan tras la interacción del BDNF con su receptor [ver Fig.5] (Finkbeiner et al., 1997; Patapoutian y Reichardt, 2001; Minichiello et al., 2002; Ying et al., 2002), muestran la activación de patrones de señalización que involucran tres proteínas principalmente: proteínas activadas por mitógenos (MAPK), fosfolipasa-C (PLC) y la proteína fosfo-inositol-3 cinasa (PI3K). Se ha observado que MEK es capaz de permitir la activación de PI3K así como la de MAPK (Atwal et al., 2000). Posteriormente, estas proteínas activan una cadena de eventos moleculares que finalmente translocan al núcleo (Gunn-More y Távare, 1998; Patapoutian y Reichardt, 2001) y una vez en el interior, transfieren un grupo fosfato para la activación del factor de transcripción CREB que participa en la modulación de la transcripción de una gran variedad de genes que contienen sitios sensibles a él, denominados CRE (cAMP responsive element). Unas de las proteínas que se activan en relación con esta cadena molecular son la sinaptobrevina y la sinaptofisina (Yamada et al., 2002) que están encargadas de la modulación del número de vesículas que se anclan a la terminal presináptica, induciendo así, la liberación de más neurotransmisor (Li et al., 1998), lo cual permite que las células respondan mejor a la estimulación. Como se mencionó anteriormente, la serie de eventos moleculares que se presentan a

causa del fenómeno de la LTP presenta varias similitudes entre éstos y los inducidos por medio del BDNF en la interacción con su receptor. La entrada de calcio al interior de la célula postsináptica, a través de los receptores NMDA, activa una serie de proteínas cinasas, que activan distintas vías de transcripción en el interior de la célula haciendo posible el mantenimiento del incremento en la eficacia de la comunicación sináptica por períodos prolongados (Kennedy y Marder, 2002). La activación de estas proteínas permite la interacción con el núcleo activando el factor de transcripción CREB (Hagiwara et al., 1993) que participa en la modulación de la transcripción de una gran variedad de proteínas. En la presente investigación con el fin de analizar la activación del factor de transcripción CREB tras la infusión de BDNF, efectuamos ensayos inmunohistoquímicos para CREB fosforilado (P-CREB), en análisis realizados 15 minutos, 30 minutos, 3 horas, 6 horas, 9 horas y 12 horas posteriores a la administración de BDNF. En este sentido nuestros resultados muestran que CREB se encuentra fosforilado hacia los 30 minutos posteriores a la infusión de BDNF, dicha fosforilación permanece tres horas más tarde y declina hacia las 6 horas, lo que concuerda con estudios previos (Ying et al., 2002). También encontramos que CREB es reactivado hacia las 9 horas posteriores a la infusión de BDNF, y decae nuevamente hacia las 12 horas. Esto concuerda con hallazgos en los que se observa una reactivación de proteínas a diferentes ventana de tiempo (Bekinschtein et al., 2008; Shimizu et al., 2001).

Es bien conocido que el BDNF juega un papel importante durante el desarrollo cortical dependiente de la actividad y en la regulación de la excitabilidad cortical (Akaneya et al., 1997, Carmignoto et al., 1997, McAllister et al., 1999). La activación de la vía de señalización BDNF/TrkB afecta la formación de la memoria, implicando a la cadena de MAPK (Yamada et al., 2002). El aprendizaje espacial y la LTP incrementan la fosforilación de los receptores TrkB en el giro dentado, lo que sugiere la posible señalización del BDNF en los mecanismos subyacentes al aprendizaje espacial (Shaw et al., 2003). Recientes experimentos indican que la señalización BDNF/TrkB converge en la vía MAPK a través de la activación de ERK

(extracelular signal-regulated kinase) para aumentar la transmisión sináptica *in vivo*, así como el aprendizaje conductual dependiente del hipocampo y de la neocorteza (Messaoudi et al 2002; Tyler et al., 2002; Ying et al., 2002). Concordante con estos estudios, nuestros resultados muestran que los inhibidores para MAPK y PI3K bloquean el efecto del BDNF sobre la retención del CAS. Investigaciones realizadas por Jones y colaboradores en 1999, señalan que la LTP neocortical origina la activación de ERK (MAPK). El incremento de la expresión de ARNm para BDNF ocurre en conjunto con el incremento de sinapsina y TrkB, lo que sustenta modificaciones pre y postsinápticas (Gómez-Pinilla y Kesslak, 2003). También se ha involucrado al BDNF y su receptor de alta afinidad TrkB en la formación de la memoria espacial en el hipocampo (Mizuno et al., 2003). Experimentos realizados con inhibidores del BDNF o de su receptor (como el K252a) debilitan o anulan la LTP así como la retención de diversas formas de aprendizaje (Ma et al., 1998; Mizuno et al., 2000). Nuestras investigaciones muestran que el grupo infundido con la combinación BDNF+K252a, presentó una retención menor respecto a los demás grupos, durante la primera y segunda sesiones de extinción, lo que sugiere la influencia del bloqueador de los receptores Trk aún sobre las acciones de la neurotrofina endógena del sistema (Castillo et al., 2006). Lo anterior subraya el que los mecanismos que subyacen a la retención de información en la corteza insular está mediada por la activación del BDNF en combinación con su receptor y que involucra la participación de MAPK y PI3K para llevar a cabo sus acciones en los cambios plásticos de largo plazo. La literatura reporta numerosos hallazgos en los que la presencia de BDNF exógeno incrementa la transmisión sináptica a través de sus receptores Trk en neuronas hipocampales, mientras que la presencia de la combinación (BDNF+K252a) bloquea la depolarización de la membrana (Kafitz et al., 1999; Levine et al., 1995).

Nuestras investigaciones muestran que la microinfusión intracortical aguda de BDNF (en concentraciones capaces de inducir LTP en ausencia de estimulación de alta frecuencia) en la corteza insular de ratas adultas, incrementa significativamente la retención del

condicionamiento aversivo a los sabores, así como que el BDNF efectúa tales acciones por medio de mecanismos moleculares que involucran a las proteínas MAPK y PI3K. El presente estudio se une a las evidencias que demuestran que el BDNF y sus receptores TrkB participan en los procesos de aprendizaje y memoria (McAllister et al., 1999; Tyler et al., 2002; Yamada et al., 2002). En este caso en un área neocortical asociada a los procesos de adquisición y almacenamiento de diversas tareas aversivas como el condicionamiento aversivo a los sabores (Escobar y Bermúdez-Rattoni, 2000; Bermúdez-Rattoni, 2004). Así como que la activación de varias cascadas de señalización posteriores a la interacción BDNF/TrkB es necesaria para los efectos que el BDNF puede originar a largo plazo en los procesos de aprendizaje y memoria (Ying et al., 2002; Reichardt, 2003; Hugues et al., 2006; Ou y Gean, 2006). La convergencia entre los patrones de señalización activados por BDNF/TrkB y por la estimulación capaz de inducir LTP, coadyuva a la comprensión de los mecanismos celulares que subyacen a los cambios en la eficiencia sináptica implicados en los procesos de aprendizaje y memoria. Las investigaciones en torno a las bases biológicas del aprendizaje y la memoria han ido confirmando el postulado que Ramón y Cajal realizó en 1894, al afirmar que nuestro cerebro sufre modificaciones estructurales y funcionales a través de lo que experimentamos. Esta visión cada día más aceptada, conlleva implicaciones importantes para el estudio de los procesos mentales y para toda la psicología en general.

FASE II

Efectos del entrenamiento en el CAS sobre la subsecuente inducción de LTP.

En estudios previos en nuestro laboratorio se mostró que la inducción de LTP en la corteza insular previa al entrenamiento del CAS, aumenta la retención de este condicionamiento (Escobar et al., 2000). Lo anterior muestra que un cambio plástico en una vía relacionada con la memoria gustativa modifica la retención de la memoria en una tarea conductual. Los resultados derivados de la presente investigación muestran que el entrenamiento en el CAS bloquea la inducción subsecuente de LTP en la vía que va del núcleo basolateral amigdalino a la corteza insular, así como que tal efecto se prolonga hasta por 120 horas. Tanto los resultados del 2000 como los resultados presentes, sugieren una coincidencia entre los mecanismos celulares que subyacen a la LTP en la corteza insular así como al CAS. Estos resultados concuerdan con hallazgos recientes en los que se observa que tareas conductuales que involucran aprendizaje motor o aprendizaje olfativo, modifican la respuesta en la eficacia sináptica (Monfils y Teskey, 2004; Rioult-Pedptti et al., 1998; Quinlan et al., 2004; Ziemann et al., 2004). Estos resultados muestran que el entrenamiento en el CAS produce un cambio en la habilidad para inducir subsecuente plasticidad sináptica en la vía BLA-CI que participa en el condicionamiento aversivo a los sabores. Ambos fenómenos se modifican mutuamente cuando se presenta uno después del otro, lo cual nos indica que los dos fenómenos utilizan la misma maquinaria biológica para ejercer sus acciones, lo anterior sugiere que la tarea conductual modificó el umbral θ_m en la vía BLA-CI. En este estudio encontramos también que el efecto producido por el CAS sobre la LTP se mantiene durante por lo menos 120 horas después de concluida la fase conductual. Este resultado es concordante con las observaciones de Schroeder y Shinnick-Gallagher en 2005, donde el condicionamiento al miedo bloqueó la inducción de LTP en la amígdala lateral hasta diez días después del condicionamiento al miedo. Ambos resultados muestran cambios metaplásticos que son mantenidos durante días debido al entrenamiento en una tarea conductual. Huang et al 1992, mostraron que el efecto metaplástico es temporal, ya que 90 minutos después de que se presente la modificación metaplástica, se pudo inducir la

LTP de forma normal. La diferencia de ventanas temporales entre la investigación de Huang et al., 1992 con la realizada por (Schroeder y Shinnick-Gallagher, 2005) la presente no se contradice. La preparación de Huang et al 1992, se realizó en el hipocampo *in vitro*, mientras que las otras dos investigaciones se realizaron *in vivo*. Los cambios plásticos *in vivo* no dependen únicamente de las propiedades biofísicas de las neuronas individualmente, si no que el mantenimiento de los cambios plásticos depende de la red neuronal involucrada. Lo anterior sugiere un equilibrio dinámico presente durante la estabilización de la memoria (Schroeder y Shinnick-Gallagher, 2005).

Posibles mecanismos del efecto metaplástico

La actividad sináptica puede producir respuestas neuronales persistentes que no necesariamente se traducen en cambios perceptibles de la fortaleza sináptica. Algunos de estos cambios modifican la capacidad de la sinapsis para experimentar subsecuentes modificaciones tras nuevos episodios de actividad sináptica. A esta clase de plasticidad modulada dependiente de actividad, se le ha denominado metaplasticidad. Fisiológicamente dicho fenómeno se ha visto reflejado en la inhibición de LTP y la facilitación de LTD (Huang et al., 1992; Malenka, 1991; Rioult-Pedotti et al, 2002; Schroeder y Shinnick-Gallagher, 2005). Recientemente Rioult-Pedotti et al. (2007) mostraron que el aprendizaje promueve un cambio en el rango de las modificaciones sinápticas futuras. Este tipo de modulación, según investigaciones recientes se deben al cambio en la proporción de receptores que contengan a las subunidades NR1/NR2A ó NR2B (Liu et al., 2004, Pérez-Otaño y Ehlers; 2005; Massey et al., 2004; Escobar y Derrick, 2007). La presencia diferencial de las subunidades se traduce en modificaciones de las concentraciones de calcio que penetran al interior neuronal, lo cual a su vez permite la activación diferencial de cascadas de señalización (Malenka et al., 1999, Zhao et al., 2005). Escobar y colaboradores observaron que tras aplicar estimulación de alta frecuencia en la vía Bla-CI se induce LTP dependiente de los receptores NMDA. En este mismo sentido

investigaciones de Roseblum et al., 1997 subrayan la participación de los receptores NMDA durante el CAS, mostrando que la subunidad NR2B es esencial tanto para el reconocimiento de un sabor novedoso, como para la asociación del estímulo incondicionado. Asimismo se ha observado que la fosforilación de la subunidad NR2B perdura por lo menos durante una hora después de la adquisición de tareas en las que interviene la corteza insular o prefrontal (Roseblum et al., 1998, Zhao et al., 2005). Por otra parte una investigación reciente muestra incrementos en la expresión de ARNm para la subunidad NR2A, 24 horas después de someter a ratones a un aprendizaje sensorial, mientras que la subunidad NR2B incrementa una hora después dicho entrenamiento, pero no se mantiene 24 horas más tarde (Skibinska et al., 2005). Al parecer ambas subunidades contribuyen a la plasticidad sináptica (Toyoda et al., 2005), el cambio en la proporción de las subunidades es atribuido a un posible remodelamiento anatómico, inducido por el aprendizaje (Skibinska et al., 2005). En humano Bütefisch et al, (2000) encontraron resultados consistentes con los encontrados en ratas. La administración sistémica de bloqueadores de los receptores NMDA (dextrometofán) o agonistas de receptores GABA A (lorazepam) bloquean la plasticidad dependiente de la actividad en el área correspondiente a la representación de la mano en la corteza motora. A este respecto, otra investigación reciente mostró la relación del aprendizaje con los cambios en la excitabilidad neuronal en humanos. Se entrenó a sujetos humanos en una tarea motora y se observó una alta correlación del aprendizaje con un rápido cambio en la excitabilidad de la corteza motora primaria (Muellbacher et al., 2001), de manera similar a lo encontrado en ratas por Rioult-Pedotti et al., en 1998 durante la ejecución de la tarea del condicionamiento al miedo. Ziemann et al., en 1998 entrenaron a un grupo de sujetos humanos en una tarea que consistía en incrementar la velocidad en el movimiento de su dedo pulgar, posterior al aprendizaje motor emplearon estimulación magnética transcraneal dirigida al área representativa de la mano en la corteza. Los resultados mostraron que la tarea de aprendizaje produce un decremento en la potenciación de la eficacia sináptica, lo cuál puede explicarse como un

efecto metaplástico o una modificación en el umbral θ_m (Ziemann et al., 2004).

Resumiendo, nuestros resultados muestran que el entrenamiento en el CAS afecta la inducción subsecuente de la LTP en la corteza insular hasta 120 horas después del entrenamiento. Estas investigaciones sugieren que la memoria del CAS comparte mecanismos celulares comunes con la LTP en la corteza insular. Así como que el efecto producido por el CAS sobre la subsecuente inducción de LTP es un efecto metaplástico, en el que el entrenamiento en el CAS modifica los umbrales de respuesta ante estímulos de alta frecuencia, probablemente mediante cambios en la proporción de las subunidades del receptor NMDA.

Metaplasticidad y consolidación de información

La consolidación es el proceso por el cual la memoria se estabiliza (Dudai, 2002; Wiltgen et al., 2004). Actualmente se consideran dos niveles de consolidación, la celular (a nivel sináptico) y aquella que involucra sistemas (o estructural) (Dudai, 2002; Dash et al., 2004). La memoria reciente cambia a lo largo del tiempo, de un estado vulnerable a un estado no vulnerable después del aprendizaje (Wiltgen et al., 2004). Los estudios sobre el aprendizaje y la memoria han aportado una amplia evidencia sobre los mecanismos hipocampales en el almacén inicial de la información, estas memorias inicialmente requieren de esta estructura para almacenarse a corto plazo, pero gradualmente van siendo almacenadas en áreas neocorticales (McClelland et al., 1995, Frankland et al., 2001; Sutherland et al., 2001; Clark et al., 2002; Clark et al., 2003). Estudios recientes muestran la existencia de varios ciclos de reactivación de proteínas en ciertas ventanas de tiempo que son indispensables para la consolidación de la información (Wang et al., 2003; Bekinschtein et al., 2007; Cho et al., 2007; Dudai y Sacktor, 2007; Sanhueza et al., 2007). La metaplasticidad se acerca a la explicación sobre como el cerebro almacena la información por

tiempos prolongados. La injerencia que tiene la actividad previa en el sistema forma parte vital del futuro de la información o actividad procesada subsecuentemente. Se ha propuesto que tanto la LTP inducida por alta frecuencia, como la inducida por proteínas, como el BDNF, promueven un cambio sustancial en el umbral para almacenar memorias futuras. Numerosas investigaciones han señalado la importante participación de un grupo de proteínas en el mantenimiento de información por periodos prolongados, entre estas proteínas se encuentran el BDNF, PKM ζ , CaMKII α , CaMKII β , y el receptor NMDA, (Shimizu et al., 2001; Wang et al., 2003; Bekinschtein et al., 2007; Cho et al., 2007; Dudai y Sacktor, 2007; Sanhueza et al., 2007). La codificación de la memoria parece ser un proceso rápido en el tiempo, sin embargo la consolidación de la información es un proceso más gradual y prolongado. Podríamos pensar que en el proceso de consolidación la información almacenada está siendo constantemente renovada a través de "loops moleculares" para permitir la persistencia de la información en el sistema nervioso central. Una investigación reciente propone que los "esquemas" corticales o engramas asociativos se crean renovando la información antigua con información reciente extraída del medio, permitiendo así un trazo perdurable en la memoria (Tse et al., 2007). Esta hipótesis apoya ampliamente la existencia de varios niveles de consolidación (molecular, celular y de sistemas) y retoma la idea inicial de Hebb acerca de la activación constante del engrama para hacer un trazo fuerte y perdurable en el tiempo. Sin embargo aún hay que responder a preguntas como ¿Qué proteínas participan en ciertas ventanas temporales de la renovación de la información? ¿Qué estructuras cerebrales se encargan de llevar a cabo las diferentes etapas de la consolidación de la información? etc.

El estudio de los mecanismos celulares que sustentan a los procesos psicológicos nos acerca a la comprensión de nuestra historia individual, cuya tarea es determinar nuestra identidad personal.

Implicaciones

El BDNF no sólo media diferentes funciones del sistema nervioso central en desarrollo y adulto, sino que también recientemente ha sido involucrado en el desarrollo de diferentes enfermedades psiquiátricas y neurodegenerativas como: depresión, trastornos alimenticios y las enfermedades de Huntington, Parkinson y Alzheimer (Chao, 2006; Lynch et al., 2008). En este sentido, el empleo de modelos experimentales, reveló que el tratamiento de fármacos para controlar la depresión o la enfermedad de Parkinson, promueven el incremento de BDNF, asimismo se observaron incrementos en los niveles de ARNm para BDNF que actúa como neuroprotector ante daño cerebral inflamatorio (O'Neill et al., 2005; Duman, 2004; Li et al., 2003). Hoy en día las líneas de investigación en torno a las cascadas de señalización molecular mediadas por el BDNF en interacción con su receptor de alta afinidad TrkB, muestran avances considerables. Los estudios futuros sobre la señalización molecular que activa el BDNF permitirán conocer los mecanismos por los cuales la célula o una población neuronal modulan los procesos de aprendizaje y memoria. Los avances derivados de estos trabajos podrían tener efectos significativos sobre las nuevas estrategias para el tratamiento de los trastornos de la memoria y la cognición, así como de diversas neuropatologías humanas.

Por otro lado, en nuestro laboratorio demostramos que la infusión de BDNF en la corteza insular produce un incremento en la retención de la memoria del CAS (Castillo et al., 2006). Lo anterior indica un efecto del BDNF en el trazo de memoria de largo plazo, que se enmarca en el contexto de plasticidad homeostática, en particular, de metaplasticidad. En estudios previos mostramos que el BDNF induce LTP en la vía BLA-CI (Escobar et al., 2003) y que la inducción de LTP en esta vía, incrementa la retención del CAS (Escobar et al., 2000). Asimismo, en el presente estudio, observamos que el aprendizaje en el CAS evita la subsecuente inducción de LTP en la vía BLA-CI, lo que sugiere que un mecanismo similar a la LTP media el fortalecimiento sináptico inducido por el aprendizaje. Los párrafos anteriores son ejemplos de fenómenos metaplásticos regulados por la actividad

previa. Conocer de cerca los mecanismos involucrados en las modificaciones de los umbrales de la eficiencia sináptica nos permitirá comprender las expresiones de plasticidad homeostática durante el desarrollo neuronal, el aprendizaje, la memoria y fenómenos como las adicciones (Desai et al., 2002; Chevaleyre y Castillo, 2004; Pérez-Otaño y Ehlers, 2005). El conocimiento de los mecanismos involucrados en la plasticidad homeostática permitirá la creación de blancos terapéuticos para modular la respuesta ante el daño neuronal, así como para mitigar algunas enfermedades neurodegenerativas y psiquiátricas. Asimismo nos aporta información acerca de la plasticidad neuronal humana.

Conclusiones

Fase experimental I

- 1) La infusión intracortical del factor neurotrófico derivado del cerebro, en la corteza insular, previa al entrenamiento del condicionamiento aversivo a los sabores, incrementa la retención de dicha tarea.
- 2) El BDNF incrementa la retención del CAS a través de las cascadas de señalización de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), y por la fosfatidil-inositol-3 cinasa (PI-3K).
- 3) El BDNF induce la fosforilación del factor de transcripción CREB en diferentes ventanas temporales. La activación de CREB permanece hacia las 3 horas y es reactivada 9 horas posteriores a la infusión de BDNF.

Fase experimental II

- 1) El entrenamiento en el CAS produce un efecto metaplástico sobre la subsecuente inducción de LTP en la corteza insular.

- 2) El efecto del CAS sobre la subsecuente inducción de LTP en la CI persiste por lo menos durante 5 días después del entrenamiento.
- 3) La historia de actividad de la vía que va del núcleo basolateral amigdalino a la corteza insular modifica la posibilidad de inducir LTP en dicha área.

Referencias

Abraham, W., Logan, B., Greenwood, J. y Dragunnow, M. (2002) "Induction and experience-dependent consolidation of stable long-term potentiation lasting months in the hippocampus", *The Journal of Neuroscience*, 22: 9626-9634.

Abraham, W.C. y Hugett, A. (1997) "Induction and reversal of long-term potentiation by repeated high-frequency stimulation in rat hippocampal slices", *Hippocampus*, 7: 137-145.

Abraham, W.C. y Bear, M.F. (1996). "Metaplasticity: The plasticity of synaptic plasticity", *TINS*, 19: 126-130.

Agassandian, K., Gedney, M. y Cassell. (2006) "Neurotrophic factors in the central nucleus of amygdala may be organized to provide substrates for associative learning", *Brain Research*, 1076: 78-86

Akaneya, Y., Tsumoto, T., Kinoshita, S. y Hatanaka, H. (1997) "Brain-derived neurotrophic factor enhances Long-term potentiation in rat visual cortex", *Journal of Neuroscience*, 17: 6707-6716.

Alonso, M; Bekinschtein, P., Cammarota, M; Vianna, M; Izquierdo, I. y Medina, J. (2005) "Endogenous BDNF is required for long-term memory formation in the rat parietal cortex", *Learning and Memory*, 12:504-510.

Aoki, C., Wu. K., Elste, A., Len, G., Lin, S., McAuliffe, G. y Black, B.I. (2000) "Localization of brain-derived neurotrophic factor and TrkB receptors to postsynaptic densities of adult rat cerebral cortex", *Journal of Neuroscience Research*, 59: 454-463.

Ascher, P. y Nowak L. (1988) "The role of divalent cations in the N-methyl-D-aspartate responses of mouse central neurons in culture", *Journal of Physiology*, 399: 257-266.

Atkinson, R. y Shiffrin, R. (1968) *Human Memory: a proposed system and its control processes*. En KW Spence, JT Spence 1968 (eds). *The Psychology of Learning and Motivation: Advances and Research and Theory* (vol 2) Academic Press, New York.

Atwal, J., Massie, B., Miller, F. y Kaplan, D. (2000) "The TrkB-Shc site signals neuronal survival and local axón growth via MEK and PI3K", *Neuron*, 27: 265-277.

Avwenagha, O., Bird, M., Lieberman, A., Yan y Campbell, G. (2006) "Pattern of expression of brain-derives neurotrophic factor and tyrosine kinase B mRNA and distribution and ultrastructural localization of their proteins in the visual pathway of adult rat", *Neuroscience*, 140: 913-928.

Baddeley, A. *Psicología de la Memoria*, Editorial Debate, (1983).

Bailey, C., Giustteton, M., Huang, Y., Hawkins, R.D. y Kandel, E. (2000) "Is heterosynaptic modulation essential for stabilizing hebbian plasticity and memory?". *Nature Review Neuroscience*, 1: 11-20.

Barbacid, M. (1994) "The Trk family of neurotrophin receptors", *Journal of Neurobiology*, 10: 1037-1044.

Barria, A., Derkach, V. y Soderling, T. (1997) "Identification of the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase liphosphosforilation site in the alpha-amino-3-hydroxil-5-methyl-4-isoxazole-propionate-type glutamate receptor", *Journal of Biological Chemistry*, 272 (529): 32727-30.

Bear, M., Connors, B. y Paradiso, M. (2001) *“Neuroscience: Exploring the Brain”*. Williams and Wilkins Baltimore, EU.

Bear, M.F. (1996) “A synaptic basis for memory storage in the cerebral cortex”, PNAS USA., 93: 13453-13459.

Bear, M.F. (2003) “Bidirectional synaptic plasticity: from theory to reality”, Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci., 29: 649-655.

Bekinschtein, P., Cammarota, M., Igaz, L., Izquierdo, I. y Medina, J (2008) “BDNF and memory formation and storage”, Neuroscientist (en prensa).

Bekinschtein, P., Cammarota, M., Izquierdo, I. y Medina, J. (2007) “Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis y BDNF-dependent phase in the hippocampus”, Neuron, 53: 261-277.

Bekinschtein, P., Cammarota, M., Katche C., Slipczuk, L., Rossato, J., Goldin, A., Izquierdo, I. y Medina J. (2008) “BDNF is essential to promote persistence of long-term memory sotorage”, PNAS, 105: 2711-2716.

Bermúdez-Rattoni, F. (2004) “Molecular mechanism of taste-recognition memory”, Nature Reviews Neuroscience, 5: 209-217.

Bermúdez-Rattoni, F. y Yamamoto, T. (1998) “Neuroanatomy of CTA: lesions studies”. En Bures, J., Bermúdez-Rattoni, F. and Yamamoto, T. *Conditioned Taste Aversion*. Oxford Science Publication, USA. pp 27- 40.

Bermúdez-Rattoni, F., Introini – Collison I., Coleman- Mesches K., y McGaugh J. (1997) “Insular cortex and amygdala lesions induced after aversive training impair retention: effects of degree of training”, Neurobiology of Learning and Memory; 67:57-63.

Bermúdez-Rattoni, F., Ormsby, C.E., Escobar, M.L. y Hernández-Echegaray (1995) "The role of insular cortex in the acquisition and long lasting memory for aversively motivated behaviors". En J.L. McGaugh, Bermúdez-Rattoni, F. and Prado-Alcalá, R.A. (Eds.), *Plasticity in the central Nervous System: Learning and Memory*, Lawrens Erlbaum Associates, Hillside, N.J., pp 67-82.

Bermúdez-Rattoni, F., y J.L. ,McGaugh, (1991) "Insular cortex and amygdala lesions differentially affect acquisition of inhibitory avoidance and conditioned aversion", *Brain Research*, 549, 165-170.

Bernstein y Koh (2007) "Molecular signaling during taste aversion learning", *Chemical Senses*, 32: 99-103.

Bienestock, E.L., Cooper, L.N., y Munro, P.W. (1982) "Theory for the development of neuron selectivity: orientation specificity and binocular interaction in visual cortex", *Journal of Neuroscience*, 2: 32-48.

Blair, H., Schafe, G., Bauer, E., Rodrigues, S. y LeDoux (2001) "synaptic plasticity in the lateral amygdala: a cellular hyphotesis of fear conditioning", *Learning and Memory*, 8: 229-242.

Bliss, T.V. y Collingridge, G.L. (1993) "A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus", *Nature*, 361: 31-39.

Bliss, TVP y T Lomo (1973) "Long lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anesthetized rabitt following stimulation of the perforante path", *Journal of Physiology*, 232:331-356.

Bothwell, M. (1991) "Keeping track of Neurotrophin Receptor", *Cell*, 65: 915-918.

Bozzi, Y., Pizzarusso, T., Cremisi, F., Rossi, F. y Barsacchi, G. (1995) "Monocular deprivation decreases the expression of messenger RNA for brain-derived neurotrophic factor in the rat visual cortex", *Neuroscience*, 69: 1133-1144.

Bramham, C. (2007) "Control of synaptic consolidation in the dentate gyrus: mechanism, functions, and therapeutic implications", *Progress in Brain Research*, 163: 453-470.

Bramham, C., Bacher, K. y Sarvey, J. (1997) "LTP in the lateral perforant path is beta-adrenergic receptor-dependent", *Neuroreport*, 8: 719-724.

Bramham, C., Southard, T., Sarvey, J.M., Herkenham, M. y Brady, L.S. (1996) "Unilateral LTP triggers bilateral increases in hippocampal neurotrophin and Trk receptor mRNA expression in behaving rats: evidence for interhemispheric communication", *J Comp Neurol*, 368: 371-382.

Braun, J.J., P.S. Lasiter y S.W. Kiefer, S.W. (1982) "The gustatory neocortex of the rat", *Physiol. Psychol.*, 10: 13-45.

Brown, R. y Robertson, E. (2007) "Off-Line Processing: Reciprocal Interactions between Declarative and Procedural Memories", *The Journal of Neuroscience*, 27: 10468-10475.

Burwell, R., Witter, M. y Amaral, D. (1995) "Perirhinal and postrhinal cortices of the rat: a review of the neuroanatomical literature and comparison with findings from the monkey brain", *Hippocampus*, 5: 390-408.

Bütefisch, C., Davis, B., Wise, S., Sawaki, L., Kopylev, L. y Classen J. (2000) "Mechanisms of use-dependent plasticity in the human motor cortex", *PNAS*, 97: 3661-3665.

Carmignoto, G., Pizzarusso, T., Tia, S. y Vicini, S. (1997) "Brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor potentiate excitatory synaptic transmission in the rat visual cortex", *Journal of Physiology*, 498: 153-164.

Castillo, D., Figueroa-Guzmán, Y. y Escobar, M. (2006) "Brain-derived neurotrophic factor enhances conditioned taste aversion retention", *Brain Research*, 1067: 250-255.

Chao, M. (1992) "Neurotrophin Receptor: A Window into Neuronal Differentiation", *Neuron*, 9: 583-593.

Chao, M; Rajagopal, R. y Lee, F. (2006) "Neurotrophin signalling in health and disease", *Clinical Science*, 110: 167-172.

Chen, J., Kitanishi, T., Ikeda, T., Matsuki, N. y Yamada, M. (2007) "Contextual learning induces an increase in the number of hippocampal CA1 neurons expressing high levels of BDNF", 88: 409-415.

Chen, W. y Bear, M. (2007) "Activity-dependent regulation of NR2B translation contributes to metaplasticity in mouse visual cortex", *Neuropharmacology*, 52: 200-214.

Chen, W., Lee, S., Sato, K., Spenser, D., Sheperd, G. y Williamson, A. (1999) "Long-term modifications of synaptic efficacy in the human inferior and middle temporal cortex", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93: 8011-8025.

Chen, Y., Ieraci A., Teng H., Dall H., Meng C., Herrera D., Nykjaer A., Hempstead, L y Lee, F. (2005) "Sortilin controls intracellular sorting of brain-derived neurotrophic factor to the regulated secretory pathway", *Journal of Neuroscience*, 29 25:6156-66

Chhatwal, J., Rattiner, L., Davis, M. y Ressler, K. (2006) "Amygdala BDNF signaling is required for consolidation but not encoding of extinction", *Nature Neuroscience*, 7: 870-872.

Cho, M., Cao, X., Wang, D. y Tsien, J. (2007) "Dentate gyrus-specific manipulation of β -Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II disrupts memory consolidation", *Proc. Natl. Acad. Sci*, 104: 16317-16322.

Cirulli, F., Berry, A., Chiarotti, F. y Alleva, E. (2004) "Intrahippocampal administration of BDNF in adult rats affects short-term behavioral plasticity in the morris water and performance in the elevated plus-maze", *Hippocampus*, 14: 802-807.

Collingridge, G.L. Kehl, S.J. y McLennan, H. (1983) "Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathways of the rat hippocampus", *Journal of Physiology*, 334: 33-46.

Connor, S., Williams, P., Armstrong, B., Ivanco, P. y Weeks, A. (2006) "Long-term potentiation is associated with changes in synaptic ultrastructural in the rat neocortex", *Synapse*, 59: 378-382.

Contreras, M., Ceric, F. y Torrealba, F. (2007) "Inactivation of the interoceptive insula disrupts drug craving and malaise induced by lithium", *Science*, 318: 655-658.

Cooper, L.N. Liberman, F. y Oja, E. (1979) "A theory for the acquisition and loss of neuron specificity in visual cortex", *Biol Cybern*, 33: 9-28.

Corkin, S. Amaral, D, González, G., Johnson, K., y Hyman, B. (1997) "H.M.'s Medial Temporal Lobe Lesion: Findings from Magnetic Resonance Imaging", *Journal of Neuroscience*, 17: 3964-3979.

Dash, P., Hebert, A. y Runyan, J. (2004) "A unified theory for systems and cellular memory consolidation". *Brain Research Review*, 45: 30-37.

Davis, M. (1994). "The role of the amygdala in emotional learning", *Int. Rev. Neurobiol.* 36: 225-266.

Davis, S., Butcher, S. y Morris, R. (1992) "The NMDA receptor antagonist D-2-amino-5-phosphonopentanoate (D-AP5) impairs spatial learning and LTP *in vivo* at intracerebral concentrations comparable to those that block LTP *in vitro*", *Journal of Neuroscience* 12: 21-34.

Dechant, G., Rodríguez-Tebar, A. y Barde, Y. (1994) "Neurotrophins receptors", *Prog. Neurobiol.* 42: 347-352.

Dunn, L. y Everitt, B. (1988) "Double dissociations of the effects of amygdala and insular cortex lesions on conditioned taste aversion, passive avoidance and neophobia in the rat using the excitotoxin ibotenic acid", *Behavioral Neuroscience*, 102: 3-23.

Ebbinghaus, H. (1885) "Über das Gedächtnis: Untersuchungen zur experimentellen Psychologie", 1885: 1-169.

Edwards, F. (1995) "LTP – a structural model to explain the inconsistency", *TINS*, 18: 250-255.

Eichenbaum, H. (1997) "To cortex: thanks for the memories", *Neuron*, 19: 481-484.

Eichenbaum, H. (2001) "The hippocampus and declarative memory: cognitive mechanisms and neural codes", *Behavioural Brain Research*. 127:199-207

Eichenbaum, H. y Cohen, N. (2001) *From conditioning to Conscious Recollection: Memory Systems of the Brain*, New York: Oxford Univ Press.

Escobar, M. (1994) "El Factor de Crecimiento Neuronal en el Sistema Nervioso Central", *Ciencia*, 45: 21-34.

Escobar, M., Alcocer, I. y Bermúdez-Rattoni, F. (2002) "In vivo effects of intracortical administration of NMDA and metabotropic glutamate receptors antagonists on neocortical long-term potentiation and conditioned taste aversion", *Behavioral Brain Research*, 129: 101-106.

Escobar, M., Alcocer, I. y Chao V. (1998b) "The NMDA receptor antagonist CPP impairs conditioned taste aversion and insular cortex long-term potentiation in vivo", *Brain Research*, 812: 246-251.

Escobar, M., Barea-Rodríguez, E., Derrick, B., Reyes, J., y Martínez, J. (1997) "Opioid receptor modulation of mossy fiber synaptogenesis: independence from long-term potentiation", *Brain Research*, 751: 330-335.

Escobar, M., Figueroa-Guzmán Y. y Gómez-Palacio-Schjetnan A. (2003) "In vivo insular cortex LTP induced by brain-derived neurotrophic factor", *Brain Research*, 991: 274-279.

Escobar, M., J. Fernández, R. Guevara-Aguilar y F. Bermúdez-Rattoni (1989) "Fetal brain grafts induce recovery of learning deficits and connectivity in rats with gustatory neocortex lesion". *Brain Research* , 478: 368-374.

Escobar, M., y Bermúdez-Rattoni, F. (2000) "Long-term potentiation in the insular cortex enhances conditioned taste aversion retention", *Brain Research*, 852: 208-212.

Escobar, M., Chao, V. y Bermúdez-Rattoni, F. (1998a) "In vivo long-term potentiation in insular cortex: NMDA receptor dependence", *Brain Research*, 779: 314-319.

Escobar, M.L. y Derrick, B. Long-term potentiation and depresión as puntative mechanisms for memory formation. *In Neural plasticity and*

memory: Federico Bermúdez Rattoni. Ed. CRC Press, 2007, pp: 15-46.

Falls, W., Miserendino, M. y Davis, M. (1992) "Extinction of fear-potentiated startle: blockade by infusion of NMDA antagonist into amygdala", *Journal of Neuroscience*, 12: 854-863.

Fanselow, M. y LeDoux, J. (1993) "Why we think plasticity fear conditioning occurs in the basolateral amygdale", *Neuron*, 23: 229-232.

Finkbeiner, S., Tavazoie, S.F., Maloratsky, A., Jacobs, M.J., Harris, K.M. y Greenberg, M.E. (1997) "CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses", *Neuron*, 19: 1031-1047.

Fischer, A., Radulovic, M., Schrick, C., Sananbenesi, F., Zimmerman, J. y Radulovic, J. (2007) "Hippocampal Mek/Erk signaling mediates extinction of contextual freezing behavior", *Neurobiology of learning and memory*, 87: 149-158.

Gaffan, D. y Murray E. (1992) "Monkeys (*Macaca fascicularis*) with rhinal cortex ablations succeed in objet discrimination learning despite 24-hr intertrial intervals and fail at matching to sample despite double sample presentations", *Behav. Neurosc.*, 106: 30-38.

García, J. y Koelling, R. (1967) "A comparison of aversions induced by x-rays, toxins, and drugs in the rat", *Radiat Res Suppl*, 7:439-50.

García, J., Kimeldorf, D. y Koelling, R. (1955) "Conditioned aversion to sacharine resulting from exposure to gamma radiation", *Science*, 122: 157-158.

Gómez-Palacio, A. y Escobar, M (2007) "Codificación y retención de la memoria: el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en la plasticidad sináptica", *Revista de Neurología*, 45: 490-417.

Gómez-Pinilla, F., So, V. y Kesslak, J.P. (2001) "Spatial learning induces neurotrophin receptor and synapsin I in the hippocampus", *Brain Research*, 904: 13-19.

Gooney, M., y Lynch, M. (2001) "LTP in the dentate gyrus of the rat hippocampus is accompanied by BDNF-induced activation of TrkB", *Journal of Neurochemistry*, 77: 1198-1207.

Hagiwara, M., Brindle, P., Harootunian, A., Armstrong, R., Rivier, J. y Vale, W. (1993) "Coupling hormonal stimulation and transcription via the cyclic AMP-responsive factor CREB is rate limited by nuclear entry of protein kinase A", *Molecular Cell Biology*, 13: 4852-4859.

Hardingham, N., Glazewski, S., Pakhotin, P., Mizuno, K., Chapman, P., Giese, P. y Fox, K. (2003) "Neocortical long-term potentiation experience-dependent synaptic plasticity require α -calcium-/calmodulin-dependent protein kinase II autophosphorylation", *The Journal of Neuroscience*, 23: 4428-4436.

Harris, E., Ganong, A., y Cotman, C. (1984) "Long term potentiation in the hippocampus involves activation of N-methyl-D-aspartate receptors", *Brain Research*, 323: 132-137.

Hebb, D. (1949). "The organization of behavior". *Theor. Biol.* 2: 204-35.

Heldt, S., Stanek, L., Chhatwal, J. y Ressler, K (2007) "Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory y extinction of aversive memories", *Molecular Psychiatry*, 12: 1-15.

Horwood, J., Dufour, S., Laroche, S. y Davis, S. (2006) "Signalling mechanisms mediated by the phosphoinositide 3-kinase/Akt cascade in synaptic plasticity and memory in the rat", *European Journal of Neuroscience*, 23: 3375-3384.

Huang, E y Reichardt, L. (2003) "Trk receptors: roles in neuronal signal transduction", *Annual Review Biochemical*, 72: 609-642.

Huang, Y., Colino, A., Selig, D. y Malenka, R. (1992) "The influence of prior synaptic activity on the induction of long-term potentiation", 255: 730-733.

Huang, Y., Li, X., y Kandel, E. (1994) "cAMP contributes to mossy fiber LTP by initiating both a covalently mediated early phase and macromolecular synthesis-dependent late phase", *Cell*, 79: 69-79.

Huang, Y., Martin, K. y Kandel, E. (2000) "Both protein kinase A and mitogen-activated protein kinase are required in the amygdala for the macromolecular synthesis-dependent late phase of long-term potentiation", 20: 6317-6325.

Hugues, S., Chessel, A., Lena, I., Marsault, R. y García, R. (2006) "Prefrontal infusión of PD098059 immediately after fear extinction training blocks extinction-associated prefrontal synaptic plasticity and decreases prefrontal ERK2 phosphorylation", *Synapse*, 60: 280-287.

Igaz, L., Winograd, M., Cammarota, M., Izquierdo, L., Alonso, M., Izquierdo, I. y Medina, J. (2006) Early activation extracellular signal-regulated kinase signaling pathways in the hippocampus is required for short-term memory formation of fear-motivated learning", *Cellular and molecular neurobiology*, 26: 989-1001.

Ip, N. y Yancopoulos, G. (1996) "The neurotrophins and CNTF: two families of collaborative neurotrophic factor", *Annual Review of Neuroscience*, 19: 491-515.

Ishibashi, H., Hihara, S., Takahashi, M., Heike, T., Yokota, T. y Ikiri, A. "Tool-use learning induces BDNF expresión in selective portion of monkey anterior parietal cortex", 102: 110-112.

Jahr, C. y Stevens, C. (1987) "Glutamate activates multiple single channel conductances in hippocampal neurons", *Nature*, 325: 522-525.

Johnston, A. y Rose, S. (2001) "Memory consolidation in day-old-chicks requires BDNF but not NGF or NT-3: an antisense study", *Molecular Brain Research*, 88: 26-36.

Jones, M., French, P., Bliss, T. y Rosenblum, K. (1999) "Molecular mechanism of long-term potentiation in the insular cortex in vivo", *Journal of Neuroscience*. 19: 1-8.

Kafitz, W., Rose, R., Thoenen, H., y Konnerth, A. (1999) "Neurotrophin-evoked rapid excitation through TrkB receptors", *Nature*, 401: 919-921.

Kandel, E. (2001) "The molecular biology of memory storage: A dialogue between genes and synapses", *Science*, 294: 1030-1038.

Kandel, E. y Hawkins, R. (1992) "Bases biológicas del aprendizaje y la individualidad", *Investigación y Ciencia*, 1994: 49-57.

Kang, H. y Schuman, E. (1995) "Neurotrophin-induced modulation of synaptic transmission in the adult hippocampus", *Journal of Physiology of Paris*, 89: 11-22.

Kelly, M., Crary, J. y Sacktor, C. (2007) "Regulation of protein kinase M ζ synthesis by multiple kinases in long-term potentiation", *The Journal of Neuroscience*, 27: 3439-3444.

Kelly, M., Tao, Y., Sondhi, R. y Sacktor, C. (2007) "Actin polymerization regulates the synthesis of PKM ζ in the LTP", *Neuropharmacology*, 52: 41-45.

Kennedy, M.B. y Marder, E.M. (1992) "Cellular and molecular mechanism of neuronal plasticity". *Introduction to molecular*

neurobiology. Ed. by Hall ZW. Massachusetts: Sinauer Associates INC, pp. 463-495.

Kesslak, J., Chuang, K. y Berchtold, N. (2003) "Spatial learning is delayed and brain-derived neurotrophic factor mRNA expression inhibited by administration of MK-801 in rats", *Neuroscience Letters*, 353: 95-98.

Kesslak, P., So, V., Choi, J., Cotman, W. y Gomez-Pinilla (1998) "Learning upregulates brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid. A mechanism to facilitate encoding and circuit maintenance?", *Behavior Neuroscience*, 112: 1012-1019.

Kiefer, S.(1985). "Neural mediation of conditioned food aversions", *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 443: 100-109.

Kogan, J, Frankland, P, Blendy, J., Coblenz J., Marowitz, Z., Schutz, G. y Silva, A. (1997) "Spaced training induces normal long-term memory in CREB mutant mice", *Curr. Biol*, 7: 1-11.

Koponen, E., Voikar, V., Riekk, R., Saarelainen, T., Rauramaa, T., Rauvala, H., Taira, T. y Castrén, E. (2004) "Transgenic mice overexpressing the full-length neurotrophin receptor TrkB exhibit increases activation of the TrkB-PLC γ pathway, reduce anxiety, and facilitated learning", *Molecular and Cellular Neuroscience*, 26: 166-181.

Korte M., Carroll P., Wolf E., Brem G., Thoenen H., y Bonhoeffer T. (1995) "Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor", *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 92: 8856-8860.

Krettek, J. y Price J. (1974) "A direct input from the amygdala to the thalamus and the cerebral cortex". *Brain Research* , 67: 169-174.

Lasiter, P.S., Glanzman, D.L. y Mensah, P.A. (1982) "Direct connectivity between pontine taste areas and gustatory neocortex in rat", *Brain Research*, 234: 111-121.

Lavenex, P. y Amaral, D. (2000) "Hippocampal-neocortical interaction: a hierarchy of associativity", *Hippocampus*, 10: 420-430.

LeDoux, J. (1993) "Emotional memory system in the brain", *Behavioral Brain Research*, 58: 69-79.

Levine, E., Dreyfus, C., Black, I. y Plummer, M. (1995) "Brain-derived neurotrophic factor rapidly enhances synaptic transmission in hippocampal neurons via postsynaptic tyrosine kinase receptors", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92. 8074-8077.

Lindsay, R., Wegand, S., Altar, C. y DiStefano, P. (1994) "Neurotrophic factors: from molecule to man", *TINS*, 17: 182-190.

Lu, B. y Chow, A. (1999) "Neurotrophins and hippocampal synaptic transmission and plasticity", *Journal of Neuroscience Research*, 58: 76-87.

Ma, Y.L., Wang, H.L., Wu, H.C., Wei, C.L., Lee E.H., (1998). "Brain-derived neurotrophic factor antisense oligonucleotide impairs memory retention and inhibits long-term potentiation in rats", *Neuroscience*, 82: 957-967.

MacDermoto, A. Mater, M., Westbrook, G., Smith, S. y Braker, J. (1986) "NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurons", *Nature*, 321: 519-522.

Malenka R., Kauer, J., Mauk, M., y Kelly, P. (1989) "An essential role for postsynaptic calmodulin and protein kinase activity in long term potentiation", *Nature*, 340: 554-557.

Malenka, R. (1991) "Postsynaptic factors control the duration of synaptic enhancement in area CA1 of the hippocampus", *Neuron*, 6: 53-60.

Malenka, R. (1994) "Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD", *Cell*, 78: 535-538.

Malenka, R. y Bear, M. (2004) "LTP and LTD an Embarrassment of Riches", *Neuron*, 44: 5-21.

Malenka, R. y Nicoll, R. (1993) "NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms", *TINS*, 16: 521-527.

Malenka, R.C. (1994). "Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD", *Cell*, 78: 535-538.

Maren, S. (1996) "Synaptic transmission and plasticity in the amygdala". *An emerging physiology of fear conditioning circuits*", *Molecular Neurobiology*, 13: 1-22.

Martin, S.J. y Morris R.G.M. (2002) "New life in an old idea: the synaptic plasticity and memory hypothesis revisited", *Hippocampus*, 12: 609-636.

Martínez, J. y Derrick B. (1996). "Long term potentiation and learning", *Annual Review of Psychology*, 47: 173-203.

Matthies, H. (1989). "In search of cellular mechanism of memory", *Prog. Neurobiology*, 32: 277-349.

Mayes, 1983. "Learning and memory disorders and their assessment", *Neuropsychologia*, 24, 25-39.

Mayford, M., Bach, M.E., Huang Y., Wang L., Hawkins, R. y Kandel, E. (1996) "Control of memory formation through regulated expression of CaMKII transgene", *Science*, 274: 1678-1683.

McAllister, A., Katz, L., y Lo, D. (1999) "Neurotrophins and synaptic plasticity", *Ann. Rev Neuroscience.*, 7: 295-318.

McGaugh, J., Cahill, L., Parent, M., Mesches, M., Coleman-Mesches, K., y Salinas, J. (1995) Involvement of the amygdala in the regulation of memory storage. *In* J. L. McGaugh, F., Bermúdez-Rattoni and R. A. Prado Alcalá. Eds.), *Plasticity in the central nervous system: Learning and memory*, Mahwah NJ: Lawrence Erlbaum Associates.

McGaugh, J., Introini-Collison, I., Nagahara, A., Cahill, L., Brioni, J. y Castellano, C. (1990). "Involvement of the amygdaloid complex in neuromodulatory influences on memory storage", *Neuroscience Behavioral Review*, 14: 425-431.

McGowan, B., Hankins, W.G., y García, J. (1972) "Limbic lesions and control of the internal and external environment", *Behavior and Biology*, 7: 841-852.

McKernan, M.G. y Shinnick-Gallagher, P. (1997). "Fear conditioning induces a lasting potentiation of synaptic currents in vitro", *Nature*, 390: 607-611.

Meakin, S. y Shooter, E. (1992) "The nerve growth factor family of receptors". *TINS*, 15: 323-331.

Messaoudi, E., Ying, S., Kanhema, T., Croll, D. y Bramham, R., (2002) "BDNF triggers transcription-dependent, late phase LTP in vivo", *Journal of Neuroscience*, 22: 7453-7461.

Milner, B. (1957) "The memory defect in bilateral hippocampal lesions", *Psychiatr.Res.Rep.Am.Psychiatr.Assoc.*, 11, 43-58.

Milner, B. (1972) "Disorders of learning and memory after temporal lobe lesions in man", *Clin. Neurosurg.* 19: 421-466.

Minichiello, L., Calella, A.M., Medina, D.L., Bonhoeffer, T., Klein, R. y Korte, M. (2002). "Mechanism of Trk-mediated hippocampal long-term potentiation", *Neuron*, 36: 121-137.

Minichiello, L., Korte, M., Wolfner, D., Kuhn, R., Unsicker, K. y Cestari, V. (1999) "Trk receptors in hippocampus-mediated learning", *Neuron*, 24: 401-414.

Miranda, M. y McGaugh, J., (2004) "Enhancement of inhibitory avoidance and conditioned taste aversion memory with insular cortex infusion of 8-Br-cAMP: involvement of basolateral amygdala", *Learning and Memory*, 11: 312-317.

Mishkin, M. (1982) "A memory system in the monkey", *Philosophical R. Soc. London (biol)* 298:85-92.

Mizuno, M., Yamada, K., Olariu, A., Nawa, H., y Nabeshima, T., (2000) "Involvement of BDNF in spatial memory formation and maintenance in a radial arm maze test in rats", *Journal of Neuroscience*, 20: 7116-7121.

Moncada, D. y Viola, H. (2007) "Induction of long-term memory by exposure to novelty requires protein synthesis: evidence for behavioral tagging", *The Journal of Neuroscience*, 27: 7476

Monfils, M. y Teskey, G. (2004) "Skilled-learning-induces potentiation in rat sensorimotor cortex: a transient form of behavioural long-term potentiation", *Journal of Neuroscience*, 24: 329-336.

Montarolo, P.G., Goelet, P., Castellucci, V.F., Morgan, J., Kandel, E.R. y Schacher, S. (1986) "A critical period for macromolecular synthesis

in long-term heterosynaptic facilitation in *Aplysia*", *Science*, 234: 1249-1254.

Morimoto, K., Saito, K., Sato, S., Yamada, N. y Hayabara, T. (1998) "Time dependent changes in neurotrophic factor mRNA expresión alter kindling and long term potentiation in rats", *Brain Research Bulletin*, 45: 599-605.

Morris, R. M., Anderson, E., Lynch, G. y Baundry, M. (1989) "Selective impairment of learning and blockade long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5", *Nature*, 297: 681-683.

Mu, J., Li W., Yao, Z., y Zhou, X. (1999) "Deprivation of endogenous brain-derived neurotrophic factor results in impairment of spatial learning and memory in adult rats", *Brain Research*, 835: 259-265.

Muellbacher, W., Ziemann, U., Boroojerdi, B., Cohen, L.G. y Hallett, M. (2001) "Role of the human motor cortex in rapid motor learning", *Exp Brain Research* 136: 431-438.

Mulholland, P., Luong, T., Woodward, J. y Chandler, J. (2008) "Brain-derived neurotrophic factor activation of extracellular signal-regulated kinase is autonomous from the dominant extrasynaptic NMDA receptor extracellular signal-regulated kinase shutoff pathway", *Neuroscience*, 151: 419-427.

Müller, D. (2000). "Brain-derived neurotrophic factor restores long-term potentiation in polysialic acid-neural cell adhesion molecule-deficient hippocampus", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97: 4315-4320.

Müller, G.E. y A. Pilzecker, 1900. "Experimentelle Beiträge zur Lehre vom Gedächtnis", *Z. Psychol. Ergänzungsband* 1: 1-300.

Naimark, A., Barkai, E., Matar, M., Kaplan, Zeev, Zozlovsky, N. y Cohen, H. (2007) "Upregulation of neurotrophics factors delectively in frontal cortex in response to olfactory discrimination learning", *Neural plasticity*, 2007: 13427.

Nayak, A., Zastrow, D.J. Lickteig, R. Zahniser, N.R. y Browing, M.D. (1998). "Maintenance of late-phase LTP is accompanied by PKA-dependent increases in AMPA receptor synthesis", *Nature*, 394: 680-683.

Nerad, L., Ramírez-Ayala, V., Ormsby, C.E. y Bermúdez-Rattoni, F. (1996) "Differential effects of anterior and posterior insular cortex lesions on the acquisition of conditioned taste aversion and spatial learning", *Neurobiol. Learn. Mem.*, 66: 44-50.

Nguyen, P.V., Abel T y Kandel, E.R. (1994) "Requeriment of critical period of transcription for induction of a late phase of LTP", *Science*, 262: 1104-1107.

Nicoll, R. y Malenka, R. (1995) "Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus", *Nature*, 377 (6545): 115-118.

Ou, L. y Gean, P. (2006) "Regulation of amygdale-dependent learning by brain-derived neurotrophic factor is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol-3-kinase", *Neuropsychopharmacology*, 31: 287-296.

Pang, P., Teng, H., Zaitzev, E., Woo, N., Sakata, K., Zhen, S., Teng, K., Yung, W., Hempstead, B. y Lu, B. (2004) "Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity", *Science*, 306: 487-491.

Pastalkova, E., Serrano, P., Pinkhasova, D., Wallace, E., Fenton, A., y Sacktor, C. (2006) Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP", *Science*, 313: 1141-1144.

Patapoutian, A. y Reichardt, L.F. (2001) "Trk receptors: mediators of neurotrophin action", *Curr. Op. Neurobiol.*, 11: 272-280.

Patterson , S. L., Abel T., Deuel, T .A., Martin , K. C., Rose J. C. y Kandel (1996). "Recombinant BDNF recues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice", *Neuron*, 16, 1137-1145.

Patterson, S, L., Pittenger, C., Martin, K.C., Scanlin, H., Drake, C., y Kandel, E. R., (2001) "Some forms of cAMP-mediated long-lasting potentiation are associated with release of BDNF and nuclear translocation of phospho-MAP kinase", *Neuron*, 32, 123-140.

Paxinos, G. y Watson , C. (1995) *The Rat Brain in the stereotaxic coordinates*. Academic Press, Orlando FI.

Pérez-Otaño, I. y Ehlers, M (2005) "Homeostatic plasticity and NMDA receptor trafficking", *TRENDS in Neuroscience*: 28, 229-238.

Pollak, D., Herner, K., Hoeger, H. y Lubec, G. (2005) "Behavioral testing upregulates pCaMKII, BDNF, PSD-95 and erg-1 in hippocampus of FVB/N mice", *Behavioural Brain Research*, 163: 128-135.

Polster, M.R., Nadel y Schacter, D. (1991) "Cognitive neuroscience. Analysis of memory: A historical perspective", *Journal of Cognitive Neuroscience*, 3: 95-116.

Quinlan, E.M., Lebel, D., Brosh, I. y Barkai, E. (2004) "A molecular mechanism for stabilization of learning-induced synaptic modifications", *Neuron*, 41: 185-192.

Rampon C. y Tsien Z. (2000) "Genetic analysis of learning behavior-induced structural plasticity", *Hippocampus*, 19: 605-609.

Rampon C., Tang Y.P., Goodhouse J., Shimizu E., Kyin M. y Tsien Z. (2000). "Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice", *Nature Neuroscience*, 3: 238-244.

Reichardt, L. (2006) "Neurotrophin-regulated signaling pathways", *PhilosTrans R Soc Lond B Biol Sci* 361:1545–1564.

Remondes, M. y Schuman, E. (2004) "Role for a cortical input to hippocampal area CA1 in the consolidation of a long-term memory", *Nature*, 431:699-703.

Rempel-Clower, Zola, M., Squire, L. y Amaral, D. (1996) Three cases of enduring memory impairment following bilateral damage limited to the hippocampal formation", *Journal Neuroscience*, 16: 5233-5255.

Rex, C., Lin, C., Kramár, E., Chen, L., Gall, C. y Lynch, G. (2007) "Brain-derived neurotrophic factor promotes long-term potentiation related cytoskeletal changes in adult hippocampus", *The Journal of Neuroscience*, 27: 3017-3029.

Richardson, S. (1973) "The amygdala: historical and functional analysis", *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 33: 623-648.

Riout-Pedotti, M., Friedman, D. y Donoghue, J. (2000) "Learning-Induced LTP in Neocortex", *Science*, 290: 533-536.

Riout-Pedotti, M., Donoghue, J. y Dunaevsky, A. (2007) "Plasticity of the synaptic modification range", *Journal of Neurophysiology*, 98: 3688-3695.

Riout-Pedotti, M.S. Friedman, D., Hess, G. y Donoghue, J.P. (1998). "Strengthening of horizontal cortical connection following skill learning", *Nature Neuroscience*, 1: 230-234.

Roberts, L.A., Large, C.H., O' Shaughnessy, C.T. y Morris, B.J. (1997) "Long term potentiation in perforant path/granule cell synapses is associated with a post-synaptic induction of proenkephalin gene expression", *Neuroscience Letters*, 227: 205-208.

Roesler, R., Roozendaal, B., y McGaugh, J.L. (2002). "Basolateral amygdala lesions block the memory-enhancing effect of 8-Br-cAMP infused into the entorhinal cortex of rats after training", *European Neuroscience*, 15: 905-910.

Rogan, M.T., Staubli, U.V. y LeDoux, J.E., (1997). "Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala", *Nature*, 390: 604-607.

Sallin, S., Zirrgiebel, U., Honsa, K., Julien, J., Millar, F., Kaplan, D. y Sweatt. (2004) "Neuronal MEK is important for normal fear conditioning in mice", *Journal of Neuroscience Research*, 75: 760-770.

Sanhueza, M., McIntyre, C. y Lisman, J. (2007) "Reversal of synaptic memory by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor", *The Journal of Neuroscience*. 27: 5190-5199.

Satoh, Y., Endo, S., Ikeda, T., Yamada, K., Ito, M., Kuroki, M., Hiramoto, T., Imamura, O., Kobayashi, Y., Itohara, S. y Takishima, K. (2007) "Extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2) knockdown mice show deficits in long-term memory; ERK2 has a specific role in learning and memory", *The Journal of Neuroscience*. 27: 10765-10776.

Schinder, A.F. y Poo M.M. (2002) "The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity", *TINS*, 23: 639-645.

Schuman, E. (1997) "Growth factors sculpt the synapses", *Science*, 275: 1277-1278.

Scoville, W. y Milner, B. (1957) "Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions", *Journal Neurology Neurosurgical Psychiatric* 20: 11-21.

Segal, R. y Greenberg, M. (1996) "Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors", *Annu. Rev. Neurosc.*, 19: 463-489.

Schachter D L, Tulving E, 1994 "What are the memory systems of 1994?", in *Memory Systems 1994* Eds D L Schachter, E Tulving (Cambridge, MA: MIT Press) pp 1 – 38.

Shaw N., Commins S. y O'Mara M. (2003) "Deficits in spatial learning and synaptic plasticity induced by rapid and competitive broad-spectrum cyclooxygenase inhibitor ibuprofen are reversed by increasing endogenous brain-derived neurotrophic factor", *European Journal of Neuroscience*, 17: 2438.

Shema R., Sacktor T.C., y Dudai, Y. (2007) "Rapid erasure of long-term memory associations in the cortex by an inhibitor of PKM zeta". *Science*, 17: 951-953.

Sherwood, N. y Lo L. (1999) "Long term enhancement of central synaptic transmission by chronic BDNF treatment", *Journal of Neuroscience*. 19: 7025-7036.

Silhol, M., Arancibia, S., Maurice, T. y Arancibia, T. (2007) "Spatial memory training modifies the expression of brain-derived neurotrophic factor tyrosine kinase receptors in young and aged rats", *Neuroscience*, 146: 962-973.

Silva, A.J. Kogan, J.H. Frankland, P.W. y Kida, S. (1998) "CREB and memory". *Annual Review of Neuroscience*, 21: 127-148.

Simon, S., Araujo, I., Gutierrez, R. y Nicoleis, M. (2006) "The neural mechanism of gustation: a distributed processing code", *Nature*, 7: 890-901.

Soulé, J., Messaoudi, E. y Bramham, C. (2006) "Brain-derived neurotrophic factor and control of synaptic consolidation in the adult brain". 34: 600-604.

Squire, L. (1992). "Memory and hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans", *Psychol. Rev*, 99: 195-231.

Squire, L. y Knowlton, B. (1999) "The medial temporal lobe, the hippocampus, and the memory systems of the brain". In *the Cognitive Neuroscience*, ed. M Gazzaniga, pp. 765-799. Cambridge, MA: MIT Press. 1276 pp 2nd ed.

Squire, L. y Zola-Morgan, S. (1991) "The medial temporal lobe memory system". *Science*, 253: 1380-1386.

Stefan, K., Kunesh, E., Cohen, L.G. Benecke, R. y Classen, J. (2000). "Induction of plasticity in the human motor cortex by paired associative stimulation". *Brain Research*, 123: 572-584.

Stefanacci, L., uffalo, E. Schmolck, H. y Squire, L. (2000) "Profund amnesia following damage to the medial temporal lobe: a neuroanatomical and neropsychological profile of patient E.P.", *Journal of Neuroscience*, 20: 7024-7036.

Suzuki, W y Amaral, D. (1994). "Topographic organization of the reciprocal connections between the monkey entorhinal cortex and perirhinal and parahippocampal cortices", *Journal of Neuroscience*. 14: 1856-1877.

Sweet, D. (2004) "Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory", *Current Opinion in Neurobiology*. 14: 311-317.

Tang, Y.P., Shimizu, E., Dube, G.R., Rampon, C., Kerchner, G.A., Zhuo, M., Guosong, L. y Tsien, J. (1999). "Genetic enhancement of learning and memory in mice". *Nature*, 401: 63-69.

Teng K. y Hempstead B. (2004) "Neurotrophins and their receptors: signaling trios in complex biological systems", *Cell Mol Life Sci.*, 61:35-48.

Toyoda, H., Zhao, M., Xu, H., Wu, L., Ren, M. y Zhuo, M. (2007) "Requerement of extracelular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase for long-term potentiation in adult mouse anterior cingulate cortex". *Molecular Pain.*, 3: 36.

Travers, S.P. (1993) "Orosensory processing in neural systems of the nucleus of the solitary tract" en S.A. Simon y S.T. Roper (Eds.) *Mechanisms of Taste Transduction*. CRC Press: USA. pp. 339-394.

Tse, D., Langston, R., Kakeyama, M., Bethus, I., Spooner, P., Wood, E., Witter, M. y Morris, R. (2007) "Scheme and Memory Consolidation", *Science*, 316: 76-82.

Tsumoto, T. (1992) "Long-term potentiation and long-term depression in the neocortex", *Prog. Neurobiol.*, 39: 209-228.

Tully, T. (1991) "Physiology of mutations affecting learning and memory in *Drosophila*: the missing between gene product and behavior", *TINS*, 14 (5): 163-164.

Tully, T., Boyton, S.C. y Del Vecchio, M. (1994) "Genetic dissection of consolidate memory in *Drosophila*", *Cell* 79:35-47.

Tulving E (1972) *Episode and semantic memory*. E. Tulving y W Donaldson (Eds) *Organization and memory* pp 382-402. New York Academic Press.

Tulving E. y Pearlstone Z (1966) "Availability versus accessibility of information in memory for words", *J verb learn verb behavior*, 5: 581-591.

Tyler, W. y Pozzo-Miller, L. (2001) "BDNF enhances quantal transmitter release and increases the number of docked vesicles at the active zone of hippocampal excitatory synapses", *Journal of Neuroscience*, 21: 4249-4258.

Tyler, W., Alonso, M., Bramham, C. y Pozzo-Miller, L. (2002) "From Acquisition to Consolidation: On the Role of Brain- Derived Neurotrophic Factor Signaling in Hippocampal-Dependent Learning", *Learning and Memory*, 9: 224-237.

Urban, N. y Barrionuevo, G. (1996) "Induction of hebbian and non-hebbian mossy fiber long-term potentiation by distinct patterns of high-frequency stimulation", *Journal of Neuroscience*, 16: 4293-4299.

Varon S. (1985) "Neurotrophic and developmental", *Neuroscience*, 6:73-100.

Walz, C., Jüngling, K., Lessmann. y Gottmann, K (2006) "Presynaptic plasticity in an immature neocortical network requires NMDA receptor activation and BDNF release", *Journal of Neurophysiology*, 96: 3512-3516.

Wang, J.H. y Stelzer, A. (1996). "Shared calcium signaling pathways in the induction of long-term potentiation and synaptic desinhibition in CA1 pyramidal cell dendrite", *Journal of Neurophysiology*, 75: 1687-1702.

Whitlock, J., Heynen, A., Shuler, M. y Bear, M. (2006) "Learning induces long-term potentiation in the hippocampus", *Science*, 313: 1093-1097.

Wiltgen, B., Brown, R., Talton, L., y Silva, A. (2004) "New Circuits for Old Memories The Role of the Neocortex in Consolidation", *Neuron*. 30: 101-8.

Winbrand, K., Messaoudi, E., Havik, B., Steenslid, V., Lovile, R., Steen, V y Bramham, C. (2006) "Identification of genes co-regulated with *Arc* during BDNF-induced long-term potentiation in adult rat dentate gyrus *in vivo*", *European Journal of Neuroscience*, 23: 1501-1511.

Wolters, A. Sandbrink, F., Schlottmann, A., Kunesh, E., Stefan, K., Cohen, L.G., Benecke, R y Classen, J. (2003) "A temporally asymmetric hebbian rule governing plasticity in the human motor cortex". *Journal of Neurophysiology*, 89: 2339-2345.

Yamada, K., Mizuno, M. y Nabeshima, T. (2002) "Role for brain-derived neurotrophic factor in learning and memory", *Life Sciences*, 70: 735-44.

Yamamoto, T. (2007) "Brain regions responsible for the expression of conditioned taste aversion in rats", *Chemical Senses*, 32: 105-109.

Yamamoto, T. Matsuno, R. y Kawamura, Y. (1980) "Localization of cortical gustatory area in rats and its role in taste discrimination", *Journal of Neuro psychology*, 44: 440-455.

Yamamoto, T., Fujimoto, Y., Shimura, T. y Sakai, N. (1995) "Conditioned taste aversion in rats with excitotoxic brain lesions", *Neuroscience Research*, 22: 31-49.

Yin, J.C., Wallach, J.S., Del Vecchio, M., Wilder, E.L., Zhou, H., Quinn, W.G. y Tully, T. (1994) "Induction of a dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in *Drosophila*", *Cell*, 79: 49-58.

Ying, S., Futter, M., Rosenblum, K., Webber, M.J., Hunt, S.P., Bliss, T.V.P. y Bramham, C.R. (2002) "Brain-derived neurotrophic factor induces long term potentiation in intact adult hippocampus: requirement for ERK activation coupled to CREB and up regulation of Arc synthesis", *Journal of Neuroscience*, 22: 1532-1540.

Ziemann, U. Iliac T.V., Pauli, C, Meintzschel, F. y Ruge, D (2004) "Learning modifies subsequent induction of long-term potentiation-like and long-term depression-like plasticity in human motor cortex", *The journal of Neuroscience*, 24(7): 1666-1672.

Zola-Morgan, S., Squire, S. y Amaral, D. (1986) "Human amnesia and the medial temporal región: enduring memory impairment following a bilateral lesión limited to field CA1 of hippocampus", *Journal of Neuroscience*, 6: 2950-2967.

Zola-Morgan, S., Squires, S. y Ramus, L. (1994) "Severity of memory impairment in monkeys as a function of locus and extent of damage within the medial temporal lobe memory system", *Hippocampus*, 4: 483-495.

available at www.sciencedirect.comwww.elsevier.com/locate/brainres

**BRAIN
RESEARCH**

Short Communication

Brain-derived neurotrophic factor enhances conditioned taste aversion retention

Diana V. Castillo, Yazmín Figueroa-Guzmán, Martha L. Escobar*

División de Investigación y Estudios de Posgrado, Facultad de Psicología, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México D.F., México

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 21 October 2005

Available online 20 December 2005

Theme:

Neural basis of behavior

Topic:

Neural plasticity

Keywords:

BDNF

LTP

CTA

Consolidation

Insular cortex

Trk

ABSTRACT

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) has recently emerged as one of the most potent molecular mediators of not only central synaptic plasticity, but also behavioral interactions between an organism and its environment. Our previous studies on the insular cortex (IC), a region of the temporal cortex implicated in the acquisition and storage of conditioned taste aversion (CTA), have demonstrated that induction of long-term potentiation (LTP) in the projection from the basolateral nucleus of the amygdala (Bla) to the IC, previous to CTA training, enhances the retention of this task. Recently, we found that intracortical microinfusion of BDNF induces a lasting potentiation of synaptic efficacy in the Bla-IC projection of adult rats *in vivo*. In this work, we present experimental data showing that intracortical microinfusion of BDNF previous to CTA training enhances the retention of this task. These findings support the concept that BDNF may contribute to memory-related functions performed by a neocortical area, playing a critical role in long-term synaptic plasticity.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Activity-dependent changes in synaptic strength are considered mechanisms underlying learning and memory. Increasing evidence indicates that the synthesis, secretion and actions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on synaptic transmission are regulated by neuronal activity and that BDNF itself can acutely modify synaptic efficacy (McAllister *et al.*, 1999; Poo, 2001; Schinder and Poo, 2000). Given its well-established role in functional synaptic plasticity and its ability to induce changes in synaptic morphology, BDNF has become an attractive candidate as a molecular mediator of learning and memory.

Research on the role of BDNF in learning and memory has focused on hippocampal long-term potentiation (LTP) and

behavioral tasks that are dependent on the hippocampus. In this regard, it has been demonstrated that spatial learning is associated with an increase in BDNF mRNA levels in the hippocampus (Kesslak *et al.*, 1998; Mizuno *et al.*, 2000). Furthermore, the expression of its receptor tyrosine kinase B (TrkB) in the hippocampus was selectively increased in response to spatial learning (Gómez-Pinilla *et al.*, 2001). *In situ* hybridization revealed a rapid and selective induction of BDNF expression in the CA1 subfield of the hippocampus during hippocampus-dependent contextual learning in rats (Hall *et al.*, 2000). Intracerebroventricular infusion of anti-BDNF antibodies resulted in an impairment of spatial learning in a water maze test in rats (Mu *et al.*, 1999). In the day-old chick,

* Corresponding author. Fax: +52 55 56222310.

E-mail address: mescobar@servidor.unam.mx (M.L. Escobar).

intracerebral injections of anti-BDNF antibodies impaired the avoidance of an aversive bead, whereas recombinant BDNF enhanced it (Johnston and Rose, 2001). Recently, Alonso et al. (2002) showed that hippocampal BDNF is required for the formation of both short- and long-term memory.

BDNF and its high affinity receptor TrkB are also abundantly expressed in neurons of the neocortex of the mammalian brain (Yan et al., 1997). BDNF also influences the development of patterned connections and the growth and complexity of dendrites in the cerebral cortex (McAllister et al., 1999; Xu et al., 2000; Yamada et al., 2002). BDNF enhances the magnitude of LTP induced by tetanic stimulation in visual cortex (Akaneya et al., 1997; Huber et al., 1998). In addition, BDNF induces a long-lasting potentiation of synaptic transmission in the visual cortex of young rats both in vitro (Akaneya et al., 1997) and in vivo (Jiang et al., 2001). Tokuyama et al. (2000) recently reported that BDNF mRNA is upregulated in the inferior temporal cortex during the formation of visual pair-association memory in monkeys. Similarly, increased BDNF and TrkB mRNA expression in cortical regions following formation of a social recognition memory has been reported (Broad et al., 2002).

The insular cortex (IC) is a region of the temporal cortex in the rat, corresponding to Krieg's areas 13 and 14, that has been implicated in the acquisition and storage of different aversive-motivated learning tasks like spatial maze, inhibitory avoidance and conditioned taste aversion (CTA) (Bermúdez-Rattoni and McGaugh, 1991; Bermúdez-Rattoni et al., 1995). The IC receives direct projections from the basolateral (Bla) amygdaloid nucleus, and it is well established that both the amygdaloid complex and the IC contribute to the formation and retention of taste illness memories (Bermúdez-Rattoni, 2004; Bermúdez-Rattoni and McGaugh, 1991). Conditioned taste aversion is a very robust and widely used model for the study of learning and memory processes (García, 1990). In this behavioral model, an animal acquires aversion to a novel taste when it is followed by digestive malaise. The anatomical substrates responsible for CTA learning have been well established (Bermúdez-Rattoni, 2004). In this regard, it has been shown that bilateral lesion of the IC disrupts acquisition and retention of CTA (Bermúdez-Rattoni, 2004; Yamamoto et al., 1980).

It has been reported that BDNF plays an important role in memory retention in hippocampal-dependent behavioral tasks (Ma et al., 1998; Mizuno et al., 2000; Yamada et al., 2002). In previous studies, we showed that induction of LTP in the Bla-IC projection previous to CTA training enhances the retention of this task (Escobar and Bermúdez-Rattoni, 2000). Recently, we demonstrated that acute intracortical microinfusion of BDNF in anesthetized adult rats induces a lasting potentiation of synaptic efficacy in the insular cortex (Escobar et al., 2003). In the present study, we used acute intracortical infusion of BDNF, in a concentration capable to induce a lasting potentiation of synaptic efficacy in the insular cortex, to assess directly the effect of this neurotrophin on the CTA retention.

A total of 36 male Wistar rats weighing 350–380 g were prepared for this experiment. They were housed individually under a 12/12-h light-dark cycle, with food and water ad libitum (except where indicated) and an average room temperature of 22 °C. Animals were implanted bilaterally with 23-gauge stainless steel cannulae under anesthesia

(Nembutal, 50 mg/kg i.p.) using standard stereotaxic procedures. The tips of the guide cannulae were aimed to 5 mm above the IC (Escobar et al., 1998, 2002). For all groups, microinjections were delivered through a 30-gauge dental needles as microinjectors that extended 5 mm below the previously implanted guide cannulae (reaching the IC area) (Fig. 1a). Dental needle microinjectors were attached by polyethylene tubing to a 10 µl Hamilton syringe which, in turn, was driven by a microinfusion pump (Carnegie Medicin, MA). Intracortical infusions were given to hand-restrained conscious animals 24 h before CTA training. The animals were divided into the following treatment groups: (1) VEH group (VEH, $n = 7$) which received an intracortical infusion of phosphate buffer solution (PBS, 3 µl/15 min) as vehicle; (2) cytochrome c group (CYT-C, $n = 6$), which received the same treatment as VEH group and PBS-containing recombinant cytochrome c from yeast, a protein with similar physical and chemical properties as BDNF (3 µg/3 µl, Sigma, St. Louis, MO); (3) BDNF group (BDNF, $n = 9$), which received the same treatment as the VEH group and PBS-containing BDNF (3 µg/3 µl, Alomone Labs., Jerusalem); and (4) BDNF plus K252a group (BDNF + K252a, $n = 7$), which received the same treatment as the BDNF group in combination with K252a, an inhibitor of Trk receptor tyrosine kinases (3 µg of BDNF/3 µl of K252a 20 µM, Alomone Labs., Jerusalem). K252a was prepared at a concentration of 20 µM with dimethyl sulfoxide (DMSO). The final concentration of DMSO used in the present study was 0.03–0.05% (v/v) (Jiang et al., 2001). There was an additional control group that remained intact during the whole procedure (CON, $n = 7$).

A previously described experimental procedure for CTA was used (Escobar et al., 1998, 2002). Briefly, animals were deprived of water for 12 h and then habituated to drink water from a single graduated cylinder twice a day, during 10-min trials for 4 days, until a stable water consumption baseline was attained. On the acquisition day, water was substituted for saccharin solution 0.1% (Sigma) offered in a single drinking session from a single drinking tube; 10 min later, the animals received 7.5 ml/kg i.p. of a 0.15 M solution of LiCl, which induces digestive malaise. After four more days of baseline consumption, the water was substituted newly by a 0.1% saccharin solution to test the aversion. The reduction of saccharin consumption with respect to baseline intake was used as a measure of strength of aversion. In order to determine the possible participation of BDNF in the CTA retention, a total of nine drinking tests (one every other day over the course of 18 days) were given to all groups. Upon completing the behavioral experiments, cannulated animals were histologically analyzed in order to verify the injector tip location. To clarify to what degree exogenously applied BDNF spread into the cortex as well as the time course of its elimination, the cortex was stained immunohistochemically with anti-BDNF antibody at 15 min and 1 h after BDNF infusion. The insular cortex was sectioned with a freezing microtome at 40 µm thickness. The tissue was incubated with the primary anti-BDNF antibody (1:500; Sigma) in PBS containing 0.3% Triton X-100 for 3 days at 4 °C. Sections were washed 3 times as above and incubated with a biotinylated anti-mouse antibody (1:200) for 2 h in the same buffer as the primary antibody. The immunohistochemical reaction was developed

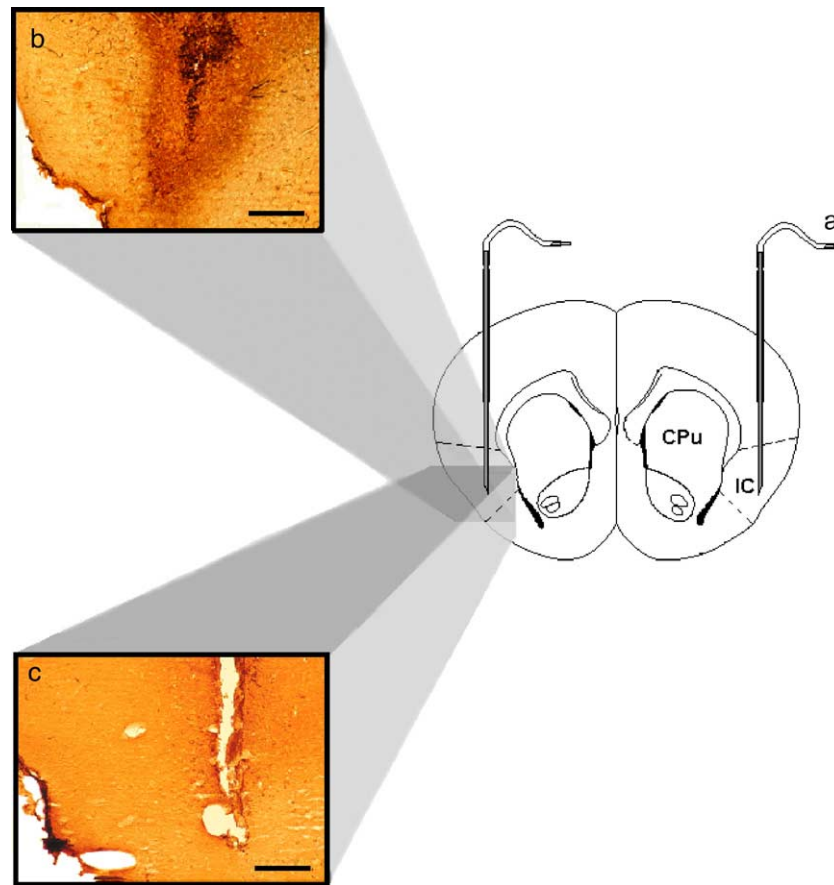


Fig. 1 – Tissue distribution and clearance of infused BDNF. (a) Schematic representation of the guide cannulae and microinjectors placement, discontinuous lines indicate the boundaries of IC area. (b, c) BDNF immunostaining obtained at 15 min and 1 h after BDNF microinfusion, respectively. BDNF was rapidly delivered and cleared from the insular cortex. Abbreviations are: CPu—caudate putamen, IC—insular cortex. Scale bar, 1 mm.

using the Vectastain ABC Elite kit (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA).

No significant differences among groups were found neither in the baseline water intake nor during the first presentation of the conditioned stimulus (saccharin flavored solution during the CTA acquisition). The average baseline means (\pm SEM) of water intake were (in ml): 16.7 ± 0.8 , 16.58 ± 0.4 , 17.1 ± 0.9 , 16.9 ± 0.7 and 17.2 ± 1 for each of the CON, VEH, CYT-C, BDNF and BDNF + K252a groups, respectively. As shown in Fig. 2, during the retention trials (CTA test), two-way ANOVA with repeated measures on the drinking test number revealed significant differences among groups $F_{4,31} = 43.64$, $P < 0.0001$ and a significant treatment \times drinking test number interaction $F_{8,32} = 2.56$, $P < 0.0001$. Post-hoc analysis with Fisher's test showed that BDNF group had a significant improvement in the retention trials as indicated by the decreased saccharin consumption when compared with the other groups during the third, fourth, fifth and sixth ($P < 0.001$) extinction trials. On the first and second extinction trials, there were no differences between groups, indicating that they all showed a maximum aversion and therefore a plateau effect. Regarding the diffusion and time course of BDNF elimination, at 15 min, BDNF immunostaining was observed in the IC around the infusion site. The borders of the

BDNF stain were sharply demarcated (Fig. 1b). At 1 h, BDNF was cleared from the IC (Fig. 1c). The time course of BDNF clearance indicates that the effects of BDNF on CTA retention do not involve the continuous presence of exogenous BDNF. These findings are in agreement with studies of Messaoudi et al. (2002).

One attractive candidate for modulating synaptic plasticity in learning and memory is brain-derived neurotrophic factor, in fact, recent findings suggest that BDNF is a key protein synthesis product, needed to carry on the necessary functions for long-lasting modification of hippocampal synapses (Pang et al., 2004). In previous studies, we demonstrated that acute intracortical microinfusion of BDNF in anesthetized adult rats induces a lasting potentiation of synaptic efficacy in the insular cortex, an area that has been implicated in the acquisition and storage of different aversive learning tasks (Escobar et al., 2002), moreover, we showed that induction of LTP in the Bla-IC projection previous to CTA training enhances the retention of this task (Escobar and Bermúdez-Rattoni, 2000). In a similar manner, the present study shows that acute intracortical microinfusion of BDNF (in a concentration capable to induce a lasting potentiation of synaptic efficacy in the insular cortex (Escobar et al., 2003)) enhances the retention of CTA. These results are also consistent with

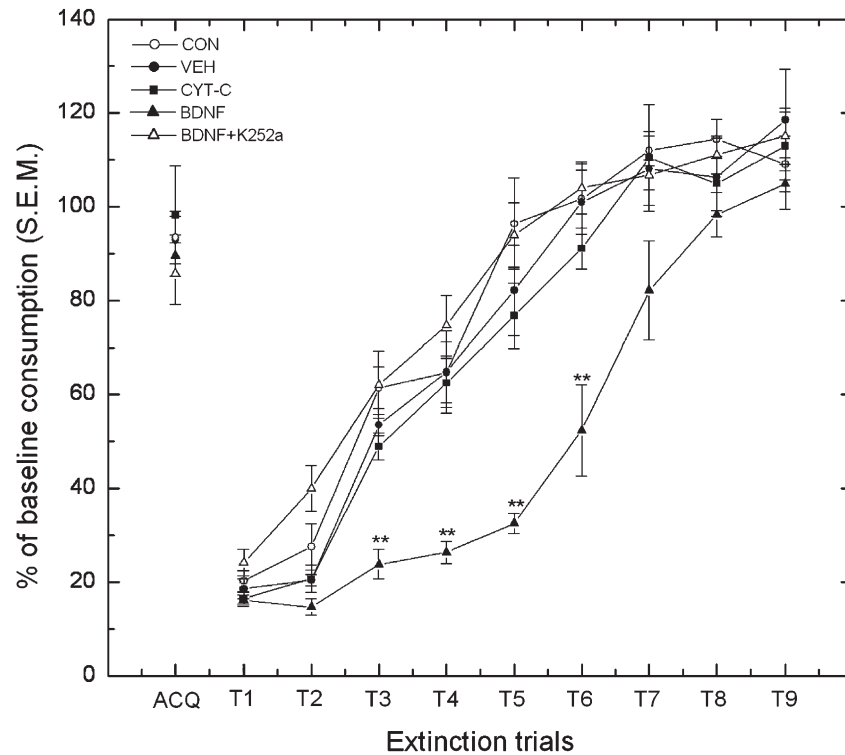


Fig. 2 – Participation of BDNF in the CTA retention. Point-plot of the acquisition session (ACQ) and nine drinking tests (T1–T9) given to VEH, CYT-C, BDNF, BDNF + K252a and CON groups. ** $P < 0.001$.

reports showing that a single intrahippocampal administration of BDNF improves memory retention in a spatial memory task (Cirulli et al., 2004). Further support comes from the recent findings showing that BDNF antisense oligonucleotide impairs memory retention and inhibits LTP in the hippocampus of adult rats (Ma et al., 1998). In the same way, Liu et al. (2004) and Rattinier et al. (2004) showed that production of BDNF and its TrkB receptor in the amygdala and the hippocampus plays a critical role in fear conditioning.

Exogenously applied BDNF has a range of short- and long-lasting effects depending on the developmental stage of the preparation and the method of application (Schinder and Poo, 2000). The question may be asked whether exogenous application is physiologically relevant. Two lines of evidence support a functional role. First, in triggering mechanisms critical to late LTP, exogenous BDNF mimics the predicted actions of endogenous BDNF (Ying et al., 2002). Second, BDNF-LTP occludes with late hippocampal LTP both in vitro and in vivo, indicating common mechanisms of expression (Messaoudi et al., 2002; Ying et al., 2002).

Our results emphasize the participation of this neurotrophin in the cellular mechanisms underlying memory processes in neocortical areas, where the long-lasting modifications that subservise certain forms of learning and memory are likely to reside.

Although the signaling pathways of BDNF/TrkB activation in learning and memory formation remain to be determined, mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway appears to be involved (Yamada et al., 2002). Studies from Minichiello et al. (2002) provide genetic evidence that TrkB mediates hippocampal plasticity via recruitment of phospho-

lipase C γ (PLC γ) and by subsequent phosphorylation of CAMKIV (calcium/calmodulin-dependent kinase IV) and CREB (cAMP response element-binding protein). Experiments from Ying et al. (2002) show that locally applied BDNF triggers a long-term potentiation (BDNF-LTP) at medial perforant path-granule synapses, the induction of which requires MEK (MAP kinase kinase)-ERK (extracellular-signal-regulated kinase) activation. They also found that BDNF-LTP is associated with ERK-dependent activation of CREB and upregulation of the immediate early gene *Arc*. Our results suggest that the effect on CTA retention is related to the potentiation elicited by BDNF infusion. In our experiments, BDNF did not enhance the retention of CTA when it was applied in combination with K252a, in agreement with our previous studies in which BDNF did not potentiate synaptic transmission when it was applied in combination with the same inhibitor of tyrosine kinases (Escobar et al., 2003). This suggests that the effect on retention is mediated by activation of Trk receptor tyrosine kinases. It is important to consider that expression of truncated TrkB (kinase-deleted isoforms) is strongly upregulated in adulthood (Eide et al., 1996), so it is probable that acute local delivery of BDNF saturates the truncated TrkB system, allowing activation of synaptic TrkB and expression of subsequent synaptic plasticity (Escobar et al., 2003; Ying et al., 2002). Recent experimental evidence indicates that BDNF/TrkB signaling converges on MAPK pathway through the activation of ERK to enhance excitatory synaptic transmission in vivo, as well as hippocampal-dependent learning in behaving animals (Alonso et al., 2002; Tyler et al., 2002). In fact, the Bla-IC LTP produces the activation of cortical ERK (Jones et al., 1999). Previous findings demonstrated the involvement of the same

molecular mechanisms in the same cortical area during taste learning (Berman et al., 1998). Thus, synaptic and behavioral plasticity seems to share common molecular mechanisms in the insular cortex (Jones et al., 1999).

In summary, our results showed that acute intracortical microinfusion of BDNF previous to CTA training enhances the retention of this task known to depend on the integrity of the insular cortex. These findings support the concept that BDNF may contribute to memory-related functions performed by a neocortical area, playing a critical role in long-term synaptic plasticity.

Acknowledgment

This work was supported by PAPIIT IN-213503.

REFERENCES

- Akaneya, Y., Tsumoto, T., Hatanaka, H., 1997. Brain derived neurotrophic factor enhances long-term potentiation in rat visual cortex. *J. Neurosci.* 17, 6707–6716.
- Alonso, M., Vianna, M.R.M., Depino, A.M., Souza, T.M., Pereira, P., Szapiro, G., Viola, H., Pitossi, F., Izquierdo, I., Medina, J.H., 2002. BDNF-triggered events in the rat hippocampus are required for both short and long-term memory formation. *Hippocampus* 12, 551–560.
- Berman, D.E., Hazvi, S., Rosenblum, K., Seger, R., Dudai, Y., 1998. Specific and differential activation of mitogen-activated protein kinases cascades by unfamiliar taste in the insular cortex of the behaving rat. *J. Neurosci.* 18, 10037–10044.
- Bermúdez-Rattoni, F., 2004. Molecular mechanisms of taste recognition memory. *Nat. Rev., Neurosci.* 5, 209–217.
- Bermúdez-Rattoni, F., McGaugh, J.L., 1991. Insular cortex and amygdala lesions differentially affect acquisition of inhibitory avoidance and conditioned taste aversion. *Brain Res.* 549, 165–170.
- Bermúdez-Rattoni, F., Ormsby, C.E., Escobar, M.L., Hernández-Echeagaray, E., 1995. The role of insular cortex in the acquisition and long lasting memory for aversively motivated behaviors. In: McGaugh, J.L., Bermúdez, F., Prado-Alcalá, R.A. (Eds.), *Plasticity in the Central Nervous System: Learning and Memory*. Lawrence Erlbaum Associates, Hillsdale NJ, pp. 67–82.
- Broad, K.D., Mimmack, M.L., Kevever, E.B., Kendrick, K.M., 2002. Increased BDNF and trk-B mRNA expression in cortical and limbic regions following formation of social recognition memory. *Eur. J. Neurosci.* 16, 2166–2174.
- Cirulli, F., Berry, A., Chiarotti, F., Alleva, E., 2004. Intrahippocampal administration of BDNF in adult rats affects short-term behavioral plasticity in the Morris water maze and performance in the elevated plus-maze. *Hippocampus* 14, 802–807.
- Eide, F.F., Vining, E.R., Eide, B.L., Zang, K., Wang, X.Y., Reichard, L. F., 1996. Naturally occurring truncated trkB receptors have dominant inhibitory effects on brain-derived neurotrophic factor signaling. *J. Neurosci.* 16, 3123–3129.
- Escobar, M.L., Bermúdez-Rattoni, F., 2000. Long-term potentiation in the insular cortex enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Res.* 852, 208–212.
- Escobar, M.L., Alcocer, I., Chao, V., 1998. The NMDA receptor antagonist CPP impairs conditioned taste aversion and insular cortex long-term potentiation in vivo. *Brain Res.* 812, 246–251.
- Escobar, M.L., Alcocer, I., Bermúdez-Rattoni, F., 2002. In vivo effects of intracortical administration of NMDA and metabotropic glutamate receptors antagonists on neocortical long-term potentiation and conditioned taste aversion. *Behav. Brain Res.* 129, 101–106.
- Escobar, M.L., Figueroa-Guzmán, Y., Gómez-Palacio Schjetnan, A., 2003. In vivo insular cortex LTP induced by brain-derived neurotrophic factor. *Brain Res.* 991, 274–279.
- García, J., 1990. Learning without memory. *J. Cogn. Neurosci.* 2, 287–305.
- Gómez-Pinilla, F., So, V., Kesslak, J.P., 2001. Spatial learning induces neurotrophin receptor and synapsin I in the hippocampus. *Brain Res.* 904, 13–19.
- Hall, J., Thomas, K.L., Everit, B.J., 2000. Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning. *Nat. Neurosci.* 3, 533–535.
- Huber, K.M., Sawtell, N.B., Bear, M.F., 1998. Brain derived neurotrophic factor alters the synaptic modification threshold in visual cortex. *Neuropharmacology* 37, 571–579.
- Jiang, B., Akaneya, Y., Ohshima, M., Ichisaka, S., Hata, Y., Tsumoto, T., 2001. Brain derived neurotrophic factor induces long-lasting potentiation of synaptic transmission in visual cortex in vivo in young rats, but not in the adult. *Eur. J. Neurosci.* 14, 1219–1228.
- Johnston, A.N.B., Rose, S.P.R., 2001. Memory consolidation in day-old chicks requires BDNF but not NGF or NT-3; an antisense study. *Mol. Brain Res.* 88, 26–36.
- Jones, M.W., French, P.J., Bliss, T.V.P., Rosenblum, K., 1999. Molecular mechanisms of long-term potentiation in the insular cortex in vivo. *J. Neurosci.* 19, 1–8.
- Kesslak, J.P., So, V., Coi, J., Cotman, C.W., Gomez-Pinilla, F., 1998. Learning upregulates brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid: a mechanism to facilitate encoding and circuit maintenance? *Behav. Neurosci.* 112, 1012–1019.
- Liu, I.Y.C., Lyons, W.E., Mamounas, L.A., Thompson, R.F., 2004. Brain-derived neurotrophic factor plays a critical role in contextual fear conditioning. *J. Neurosci.* 24, 7958–7963.
- Ma, Y.L., Wang, H.L., Wu, H.C., Wei, C.L., Lee, E.H.Y., 1998. Brain-derived neurotrophic factor antisense oligonucleotide impairs memory retention and inhibits long-term potentiation in rats. *Neuroscience* 82, 957–967.
- McAllister, A.K., Katz, L.C., Lo, D.C., 1999. Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* 22, 295–318.
- Messaoudi, E., Ying, S.W., Kanhema, T., Croll, S., Bramham, C., 2002. Brain-derived neurotrophic factor triggers transcription-dependent, late phase long-term potentiation in vivo. *J. Neurosci.* 22, 7453–7461.
- Minichiello, L., Calella, A.M., Medina, D.L., Bonhoeffer, T., Klein, R., Korte, M., 2002. Mechanism of Trk-mediated hippocampal long-term potentiation. *Neuron* 36, 121–137.
- Mizuno, M., Yamada, K., Olariu, A., Nawa, H., Nabeshima, T., 2000. Involvement of brain-derived neurotrophic factor in spatial memory formation and maintenance in a radial arm maze test in rats. *J. Neurosci.* 20, 7116–7121.
- Mu, J.S., Li, W.P., Yao, Z.B., Zhou, X.F., 1999. Deprivation of endogenous brain-derived neurotrophic factor results in impairment of spatial learning and memory in adult rats. *Brain Res.* 835, 259–265.
- Pang, P.T., Teng, H.K., Zaitsev, E., Woo, N.T., Sakata, K., Zhen, Sh., Teng, K.K., Yung, W., Hempstead, B., Lu, B., 2004. Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science* 306, 487–491.
- Poo, M.M., 2001. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat. Rev., Neurosci.* 2, 24–32.
- Rattinier, L.S., Davis, M., French, Ch.T., Ressler, K.J., 2004. Brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor B involvement in amygdala-dependent fear conditioning. *J. Neurosci.* 24, 4796–4806.

- Schinder, A.F., Poo, M.M., 2000. The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 23, 639–645.
- Tokuyama, W., Okuno, H., Hashimoto, T., Li, Y.X., Miyashita, Y., 2000. BDNF upregulation during declarative memory formation in monkey inferior temporal cortex. *Nat. Neurosci.* 3, 1134–1142.
- Tyler, W.J., Alonso, M., Bramham, C.R., Pozzo-Miller, L.D., 2002. From acquisition to consolidation: on the role of brain derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning. *Learn. Mem.* 9, 224–237.
- Xu, B., Zang, K., Ruff, N.L., Zhang, Y.A., McConnell, S.K., Stryker, M. P., Reichardt, L.F., 2000. Cortical degeneration in the absence of neurotrophin signaling: dendritic retraction and neuronal loss after removal of the receptor TrkB. *Neuron* 26, 233–245.
- Yamada, K., Mizuno, M., Nabeshima, T., 2002. Role for brain-derived neurotrophic factor in learning and memory. *Life Sci.* 70, 735–744.
- Yamamoto, T., Matsuo, R., Kawamura, Y., 1980. Localization of cortical gustatory area in rats and its role in taste discrimination. *J. Neurophysiol.* 44, 440–454.
- Yan, Q., Rosenfeld, R.D., Matheson, C.R., Hawkins, N., Lopez, O.T., Bennet, L., Welcher, A.A., 1997. Expression of brain derived neurotrophic factor protein in the adult rat central nervous system. *Neuroscience* 78, 431–448.
- Ying, S.W., Futer, M., Rosenblum, K., Weber, M.J., Hunt, S.P., Bliss, T.V.P., Bramham, C.R., 2002. Brain derived neurotrophic factor induces long-term potentiation in intact adult hippocampus: requirement for ERK activation coupled to CREB and upregulation of Arc synthesis. *J. Neurosci.* 22, 1532–1540.