



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

PROGRAMA DE DOCTORADO EN PSICOLOGÍA  
NEUROCIENCIAS DE LA CONDUCTA

## **PARTICIPACIÓN DEL FACTOR NEUOTRÓFICO DERIVADO DEL CEREBRO (BDNF) EN LA EXTINCIÓN DE UNA MEMORIA AVERSIVA A LOS SABORES**

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN PSICOLOGÍA

PRESENTA:  
LUIS MIGUEL RODRÍGUEZ SERRANO

TUTORA PRINCIPAL:  
DRA. MARTHA LILIA ESCOBAR RODRÍGUEZ  
FACULTAD DE PSICOLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. IRMA YOLANDA DEL RÍO PORTILLA	DR. ROBERTO PRADO-ALCALÁ
FACULTAD DE PSICOLOGÍA	INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

MÉXICO, D. F. ENERO 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## ÍNDICE

<b>GLOSARIO DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>4</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>6</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>7</b>
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>8</b>
<b>Mecanismos neurobiológicos del aprendizaje y la memoria</b> .....	<b>8</b>
<b>Neurobiología de la extinción</b> .....	<b>10</b>
<b>Neurotrofinas</b> .....	<b>14</b>
<b>Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF)</b> .....	<b>17</b>
<b>BDNF y plasticidad sináptica</b> .....	<b>19</b>
<b>La corteza insular y la vía gustativa</b> .....	<b>21</b>
<b>Condicionamiento de aversión a los sabores (CAS)</b> .....	<b>24</b>
<b>Extinción del CAS</b> .....	<b>26</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>30</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>31</b>
<b>PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>31</b>
<b>Sujetos</b> .....	<b>31</b>
<b>Implantación de cánulas en la corteza insular</b> .....	<b>32</b>
<b>Administración de fármacos</b> .....	<b>32</b>
<b>Condicionamiento de aversión a los sabores</b> .....	<b>33</b>
<b>Histoquímica de Nissl</b> .....	<b>34</b>
<b>Análisis de resultados</b> .....	<b>34</b>
<b>DESCRIPCIÓN DE LAS FASES EXPERIMENTALES</b> .....	<b>34</b>
<b>Fase 1</b> .....	<b>34</b>
<b>Fase 2</b> .....	<b>35</b>
<b>Fase 3</b> .....	<b>36</b>
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>37</b>

<b>Histológicos.....</b>	<b>37</b>
<b>Fase 1. La administración de BDNF en la CI promueve la extinción del CAS.....</b>	<b>38</b>
<b>Fase 2. La administración de BDNF en la CI promueve la extinción del CAS sin requerir del ensayo de extinción.....</b>	<b>40</b>
<b>Fase 3. La administración de BDNF en la CI no elimina la memoria original del CAS.....</b>	<b>42</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>44</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>47</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>48</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>62</b>

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

5-HT7	Receptor a serotonina tipo 7
7,8-DHF	7, 8-dihydroxyflavone
AC	Adenilato ciclasa
ACe	Amígdala central
AMPC	Adenosin monofosfato cíclico
AMPA	Receptor a glutamato tipo ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
Am	Amígdala
ANOVA	Análisis de varianza
AP	Anteroposterior
Arc	Gen de expresión temprana que codifica para la proteína asociada al citoesqueleto regulada por actividad
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BLA	Amígdala basolateral
CAS	Condicionamiento de aversión a los sabores
CAMK's	Cinasas dependientes de calcio-calmodulina
CaMKII	Proteína cinasa dependiente de calcio-calmodulina tipo II
CaN	Calcineurina
CB1	receptor a endocanabionde de tipo 1
CeA	Amígdala central
CI	Corteza insular
CPu	Caudado-putamen
CON	Control intacto
CM	Condicionamiento al miedo
CREB	Proteína de unión al elemento responsivo de adenosin monofosfato cíclico
CREB-1	Proteína de unión al elemento responsivo de adenosin monofosfato cíclico 1
CyT-C	Citocromo C
DCS	D-cycloserine
DV	Dorso-ventral
EC	Estímulo condicionado
EI	Estímulo incondicionado
ERK	Proteína cinasa regulada por señales extracelulares
FNT	Factores neurotróficos
FT	Factores de transcripción
HL	Hipotálamo lateral
HIP	Hipocampo
ISPs	Inhibidores de la síntesis proteínas
CIL	Corteza infralímbica
i.p.	Intraperitoneal

K252a	Inhibidor de los receptores de tirosina cinasa a neurotrofinas
LTP	Potenciación de largo plazo
LiCl	Cloruro de litio
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
mBDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro maduro
MCP	Memoria de corto plazo
mGlu7	Receptor metabotrópico a glutamato de tipo 7
MLP	Memoria de largo plazo
ML	Medio lateral
MMP	Metaloproteinasas
MSK1	Cinasa activada por mitogeno y estrés
NaCl	Cloruro de sodio
NHS	Núcleo del haz solitario
NGF	Factor de crecimiento neuronal
NPB	Núcleo parabraqueal del puente
NTS	Núcleo del tracto solitario
NVPM	Núcleo ventroposteromedial del tálamo
NMDA	Receptor a glutamato N-metil-D-aspartato
NT-3	Neurotrofina 3
NT-4/5	Neurotrofina 4/5
PBS	Amortiguador de fosfatos
PKA	Proteína cinasa A
PKC	proteína cinasa dependiente de calcio
PKM $\zeta$	proteína cinasa M $\zeta$ (zeta)
PI3-K	Fosfatidil inositol 3 cinasa
PLC	Fosfo-lipasa C
PL	Corteza prelímbica
proNTs	proneurotrofinas
proBDNF	Proteína inmadura del factor neurotrófico derivado del cerebro
PTA	Área gustativa del puente
rADQ	Readquisición
RC	Respuesta condicionada
RI	Respuesta incondicionada
RSK	Cinasa ribosomal S6
SI	Sustancia innominata;
SN	Sistema nervioso
SNC	Sistema Nervioso Central
Trk	Receptor de tropomiosina cinasa
TrkB	Receptor de tropomiosina cinasa tipo B
vmCPF	Corteza prefrontal ventromedial

## RESUMEN

Describir los mecanismos a través de los cuales el sistema nervioso almacena información por tiempos prolongados, ha representado un importante reto para las neurociencias. La neurotrofina denominada factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) ha emergido recientemente como potente mediador molecular, no sólo de la plasticidad sináptica, sino también de las interacciones conductuales entre un organismo y su ambiente. Uno de los modelos conductuales ampliamente utilizado en el estudio de los procesos de aprendizaje y memoria es el condicionamiento de aversión a los sabores (CAS), mediante el cual un animal adquiere aversión ante un estímulo gustativo novedoso cuando éste se asocia con irritación gástrica. Los sustratos anatómicos involucrados en el procesamiento del CAS están bien establecidos. En este sentido se ha demostrado que lesiones bilaterales en la corteza insular (CI), afectan la adquisición y retención de esta tarea. Estudios recientes de nuestro laboratorio muestran que la administración de BDNF previa a la adquisición del CAS, incrementa la retención del mismo. El objetivo de la presente tesis fue analizar el efecto que ejerce la administración de BDNF en la CI sobre el proceso de extinción del CAS. Con este propósito, animales entrenados en dicha tarea, recibieron una administración de BDNF en la CI una hora antes de la primera sesión de extinción. Nuestros resultados muestran que la aversión al sabor fue significativamente reducida por la administración de BDNF, desde la primera sesión de extinción. Adicionalmente, los resultados revelan que el efecto de esta neurotrofina sobre la aversión al sabor no requiere del entrenamiento de extinción. Finalmente, mostramos que el BDNF no degrada el trazo original de memoria. Los presentes hallazgos, enfatizan la participación del BDNF en los mecanismos celulares que subyacen a la extinción de la memoria en regiones neocorticales, sugiriendo que esta neurotrofina constituye una pieza clave en la regulación y mediación de las modificaciones sinápticas de largo plazo.

## INTRODUCCIÓN

Derivada de la convergencia entre la psicología cognitiva y la neurobiología surge la neurociencia cognitiva, que entre sus múltiples objetivos plantea el dilucidar los mecanismos que subyacen al procesamiento y almacenamiento de información en el sistema nervioso (Milner, Squire, & Kandel, 1998). La neurociencia cognitiva considera al aprendizaje como el proceso mediante el cual un organismo adquiere nueva información en tanto que la memoria constituye el proceso que permite almacenar la información adquirida (Bear, Connors, & Paradiso, 2007). El aprendizaje y la memoria son propiedades del sistema nervioso que permiten adquirir, retener y evocar diferentes tipos de información, contribuyendo así a la adaptación de los circuitos cerebrales al ambiente (Bear, Connors, & Paradiso, 2007). La memoria involucra cambios en las propiedades eléctricas así como alteraciones estructurales de las sinapsis. Al respecto se conoce que la neurotrofina denominada factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), constituye una pieza clave dentro de los procesos celulares que subyacen al aprendizaje y la memoria (Minichiello, 2009). La participación del BDNF en fenómenos plásticos sugiere que esta neurotrofina es capaz de establecer las condiciones para que los cambios plásticos puedan llevarse a cabo, así como de ejercer efectos directos que producen cambios en la comunicación y morfología de las sinapsis (Park & Poo, 2013; Schinder & Poo, 2000). Pese a la amplia participación del BDNF en los procesos de adquisición y consolidación de la memoria, el conocimiento en torno a su papel en el proceso de extinción es aún incipiente (Andero & Ressler, 2012).

Recientes investigaciones han reportado que los niveles de BDNF endógeno en la corteza insular experimentan incrementos significativos durante la adquisición y consolidación del condicionamiento de aversión a los sabores (CAS; un paradigma conductual en el que un animal adquiere aversión ante un estímulo gustativo novedoso cuando éste se asocia con irritación gástrica), así como en la corteza infralímbica tras la extinción de esta tarea (Xin et al., 2014).

## ANTECEDENTES

### **Mecanismos neurobiológicos del aprendizaje y la memoria**

Una de las habilidades más relevantes para la supervivencia de los seres vivos es su capacidad para adaptarse al medio ambiente. Al respecto, las neuronas experimentan modificaciones morfológicas y funcionales en respuesta a su actividad. Esta propiedad es conocida como plasticidad sináptica, considerada hoy en día como la base de fenómenos adaptativos como el aprendizaje y la memoria (Bear, Connors, & Paradiso, 2007; Citri & Malenka, 2008; Milner, Squire, & Kandel, 1998).

Como mencionamos en líneas anteriores, el aprendizaje es el proceso mediante el cual un organismo vivo adquiere información en tanto la memoria es el proceso que permite almacenar dicha información. Durante este proceso se distinguen las siguientes fases: adquisición, consolidación, evocación y extinción. Atendiendo a su duración la memoria puede ser dividida en memoria de corto (MCP) y de largo plazo (MLP), en tanto que por el tipo de información almacenada podemos referirnos a la memoria declarativa o explícita (de hechos y eventos) y a la memoria implícita o de procedimiento (Bear, Connors, & Paradiso, 2007; Milner, Squire, & Kandel, 1998).

La MCP es el almacenamiento temporal de una cantidad limitada de información recientemente adquirida, disponible de minutos a horas tras el aprendizaje, su utilidad es inmediata y requiere de modificaciones post-traduccionales de proteínas existentes pero no de la síntesis de nuevas proteínas (Izquierdo et al., 2006; Kandel, 2001). Por su parte la MLP, es el almacenamiento de una cantidad ilimitada de información durante periodos prolongados, de días, meses o años e incluso por toda la vida, su característica esencial es la persistencia en el tiempo (Sandi, 2003). En la MLP se presentan cambios plásticos relativamente duraderos, como el incremento en la densidad de botones sinápticos, en la longitud y ramificaciones axónicas, y un mayor número de espinas dendríticas (Dudai, 2002). Se ha demostrado que para que estos cambios ocurran se requiere de un incremento en la síntesis de proteínas así como de la activación de determinados genes (Dudai, 2002; Josselyn, Köhler, & Frankland, 2015; Kandel, 2001; Tonegawa, Pignatelli, Roy, & Ryan, 2015), lo cual origina el fortalecimiento de las conexiones sinápticas y la consecuente modificación de la eficiencia de la transmisión sináptica (Cammarota et al., 2005).

Estos cambios subyacen al proceso denominado consolidación en el que una memoria nueva inicialmente frágil es transformada en una memoria estable y robusta (Dudai, Karni, & Born, 2015; Josselyn et al., 2015; Robertson, Pascual-Leone, & Miall, 2004).

Entre los mecanismos que subyacen al almacenamiento de información se encuentran los cambios en la eficiencia sináptica tales como la potenciación de largo plazo (LTP), que se define como el incremento prolongado de la eficiencia sináptica debido a la estimulación de las fibras aferentes a un área determinada del sistema nervioso (Abraham, 2008; Citri & Malenka, 2008; Gómez-Palacio Schjetnan & Escobar-Rodríguez, 2007). En la actualidad la LTP representa el fenómeno primordial para el estudio de las bases celulares del aprendizaje y la memoria (Fig. 1).

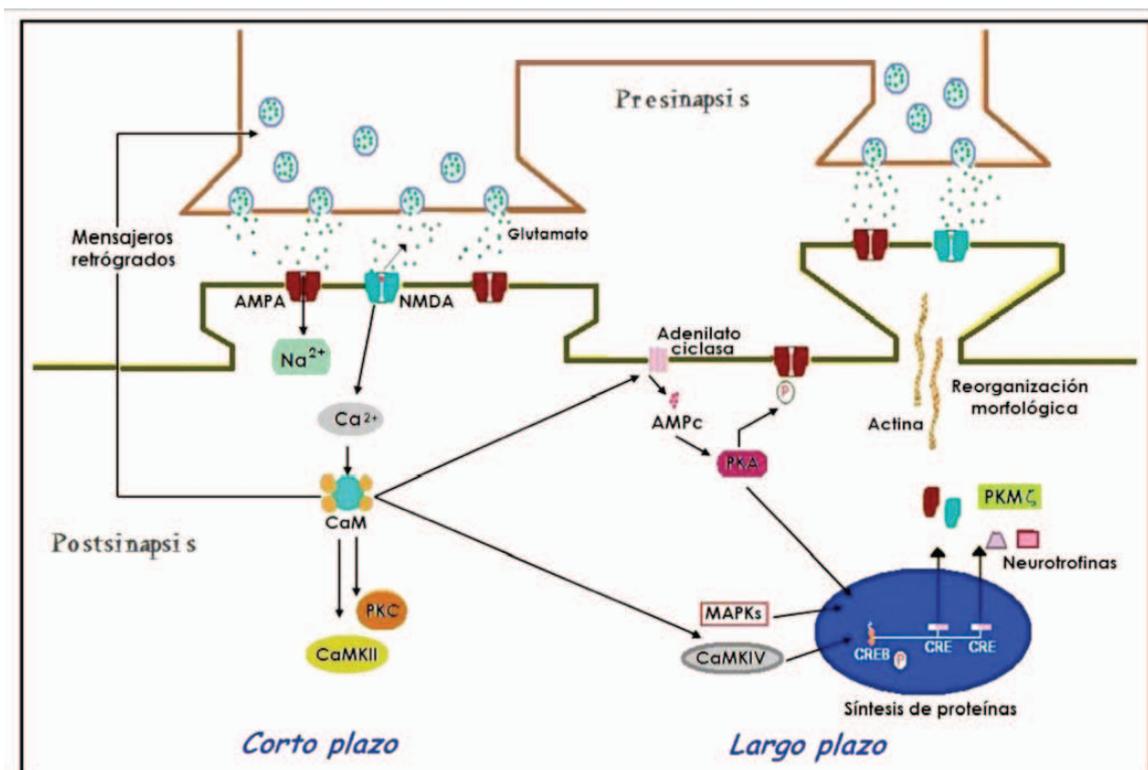


Figura 1. Mecanismos moleculares de la LTP dependiente de la activación de los receptores NMDA. Se distinguen dos fases: la fase de corto plazo o fase temprana, que requiere de la activación de proteínas existentes que favorecen la comunicación sináptica haciéndola más eficiente y la fase tardía, en la cual los elementos fundamentales son la síntesis proteínica y la formación de nuevos contactos sinápticos. NMDA: receptor glutamatérgico de tipo N-metil-D-aspartato; AMPA receptor a glutamatérgico de tipo ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico; AMPc: Adenosín monofosfato cíclico; CaMKIV proteína cinasa dependientes de calcio-calmodulina de tipo IV; PKM $\zeta$ : proteína cinasa M  $\zeta$ ; PKA: Proteína cinasa A; PKC: proteína cinasa dependiente de calcio; MAPKs: cinasas activadas por mitógenos; CREB: proteína de unión al elemento responsivo de adenosín monofosfato cíclico. Modificado de Huang, et al., (1996).

## **Neurobiología de la extinción**

El término extinción proviene en buena medida de las investigaciones de Pavlov quien observó una disminución acelerada de la respuesta condicionada en los sujetos experimentales, al presentar el estímulo condicionado (tono) en ausencia del estímulo incondicionado (comida). Pese a que Pavlov inicialmente consideró la extinción como una inhibición de la respuesta condicionada, existen otras interpretaciones que difieren en sus supuestos, acerca de cómo se forman y modifican las asociaciones entre los estímulos durante la extinción (Myers & Davis, 2007).

Una de estas aproximaciones considera la extinción como una pérdida de la asociación entre los estímulos, es decir como un desaprendizaje (Rescorla & Wagner, 1972) (figura 2b). Otra por su parte considera la extinción como un evento no asociativo, donde gradualmente la asociación entre los estímulos pierde fuerza (Myers & Davis, 2007) (figura 2d). Sin embargo, la conceptualización de extinción en términos de desaprendizaje o borrado de la información previamente adquirida ha evolucionado dando paso a la conceptualización actual que la reconoce como un fenómeno de aprendizaje altamente complejo que no involucra la desaparición del aprendizaje original (Delamater, 2004; Myers & Davis, 2007; Rescorla, 2004).

El modelo de extinción más aceptado hoy en día, considera a este fenómeno como un nuevo aprendizaje (Domjan, 2003) caracterizado por el desarrollo de una nueva asociación entre el estímulo condicionado y el incondicionado en el que se reconoce que el incondicionado ya no antecede la presencia del condicionado (Fig. 2c). Esta nueva asociación es de naturaleza inhibitoria y se caracteriza por su labilidad puesto que con el paso del tiempo puede ser desplazada por el trazo original de memoria (recuperación espontánea) o bien por el cambio de contexto (renovación) (Bouton, Westbrook, Corcoran, & Maren, 2006; Myers & Davis, 2002).

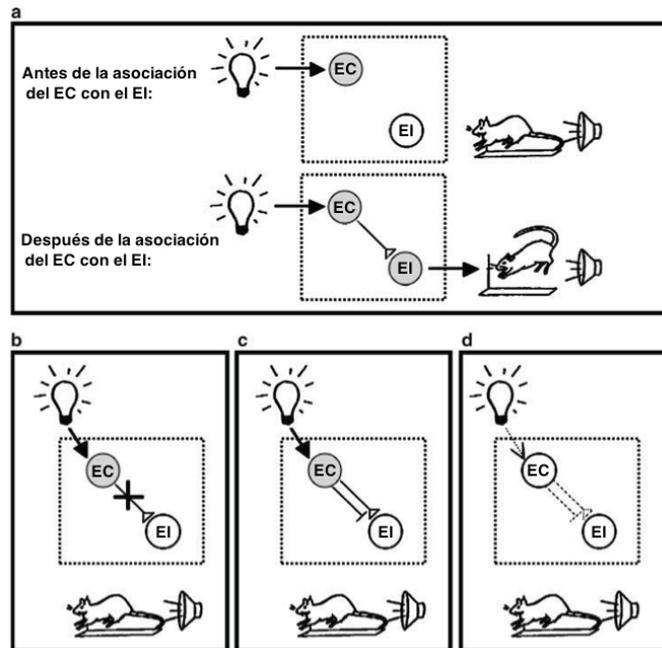


Figura 2. Diferentes modelos de extinción. a) Modelo conductual de condicionamiento al miedo, en el cual el sujeto aprende a predecir eventos aversivos. La tarea consiste en presentar un estímulo aversivo (descarga eléctrica) que se asocia ya sea a un contexto particular o bien a un estímulo neutro (tono o luz), desarrollando así la asociación correspondiente. b) Modelo que muestra la extinción como un desaprendizaje, en el que se pierde la asociación entre los estímulos. c) Modelo que muestra la extinción como un nuevo aprendizaje, donde se genera una nueva conexión inhibitoria entre los estímulos. d) Modelo que muestra la extinción como un evento en el que la asociación de los estímulos pierde fuerza. Modificado de Myers & Davis (2007).

De manera similar al aprendizaje original, durante la extinción se presentan las siguientes fases: adquisición, consolidación y evocación (Furini, Myskiw, & Izquierdo, 2014; Quirk & Mueller, 2008), Fig. 3.

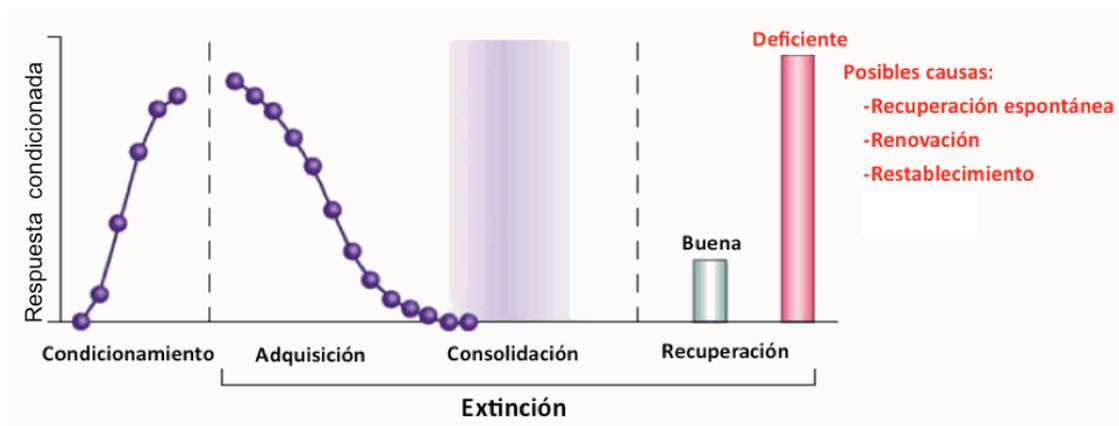


Figura 3. Fases de la extinción experimental de la memoria. Modificado de Quirk & Mueller (2008).

Durante la extinción se pueden presentar los siguientes fenómenos (Fig. 4):

- *Recuperación espontánea*, se puede presentar al realizar una prueba de memoria tras un periodo considerablemente largo.

- *Renovación*, ocurre cuando el estímulo condicionado se presenta en un contexto diferente a aquel en el que fue adquirida la extinción (Myers & Davis, 2002). Al respecto se reconoce que el contexto es un modulador importante de estos procesos (Bouton et al., 2006).
- *Restablecimiento*, puede ocurrir al presentar el estímulo incondicionado de manera inesperada.

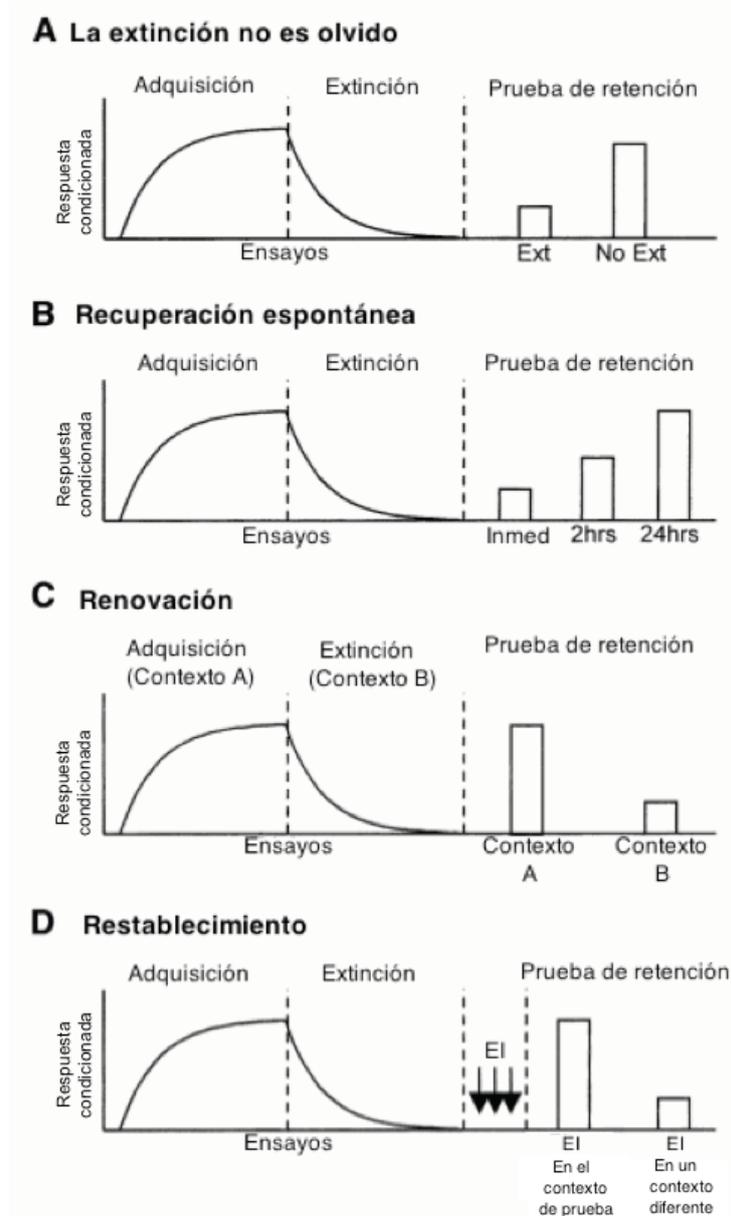


Figura 4. La extinción es un nuevo aprendizaje que se caracteriza por diferentes componentes conductuales. (A) La extinción requiere de un periodo de adquisición y no equivale a una forma de olvido. (B) Recuperación espontánea, la respuesta condicionada puede reaparecer tras un periodo prolongado. (C) Renovación, la extinción es específica del contexto en el que se adquiere, por ello la respuesta condicionada puede reaparecer al probar en un contexto distinto. (D) Restablecimiento, la respuesta condicionada puede restablecerse al presentar nuevamente el estímulo incondicionado. Modificado de Myers & Davis (2002).

Por otra parte, se han identificado tres factores capaces de modular la extinción: 1) cuanto más fuerte es la respuesta condicionada tras la adquisición, más tiempo tardará en extinguirse; 2) el número de ensayos en los que el estímulo incondicionado sigue al condicionado influye en la extinción de la respuesta condicionada; 3) el tiempo de exposición al estímulo condicionado durante los ensayos de extinción influye en la curva de su reducción (Klein, 1997).

En resumen, la extinción no representa el olvido de una tarea aprendida sino un nuevo aprendizaje que sustituye la respuesta conductual de la primera asociación (Myers & Davis, 2002). Asimismo, la extinción es un proceso activo de aprendizaje distinto al de la adquisición original que requiere de entrenamiento adicional para desarrollarse así como de un proceso de consolidación, dependiente de síntesis proteínica, para su persistencia (Berman & Dudai, 2001). De acuerdo con lo anterior, durante la extinción la respuesta condicionada puede recuperarse, debido a que el trazo original no se ha perdido (Berman, Hazvi, Stehberg, Bahar, & Dudai, 2003). Hoy en día se sabe que es posible modular el periodo de consolidación de la extinción (Myskiw, Izquierdo, & Furini, 2014).

Durante la extinción se presentan cambios conductuales así como modificaciones en la reorganización celular y molecular de las estructuras cerebrales involucradas (Kaczmarek, 1993; Pignataro & Ammassari-teule, 2015; Quirk, Garcia, & González-Lima, 2006). Entre éstas se reconoce la participación de la corteza prefrontal infralímbica (CIL) en la extinción de tareas como el condicionamiento al miedo (CM) (Santini, Sepulveda-Orengo, & Porter, 2012), el condicionamiento de aversión a los sabores (Mickley, Kenmuir, Yocom, Wellman, & Biada, 2005), así como el condicionamiento de aversión al lugar (Wang et al., 2012).

En particular, se ha reportado que durante la extinción del CM se incrementa la tasa de disparo de neuronas ubicadas en la CIL (Milad & Quirk, 2012). Asimismo, la estimulación electrofisiológica (Milad, Vidal-Gonzalez, & Quirk, 2004) u optogenética (Do-Monte, Manzano-Nieves, Quiñones-Laracuate, Ramos-Medina, & Quirk, 2015) de este área cortical acelera la extinción del CM, en tanto que el efecto contrario se observa al silenciar farmacológicamente dicha región (Sierra-Mercado, Padilla-Coreano, & Quirk, 2011). Aunado a lo anterior, se ha señalado que durante la extinción del CM se establecen rearrreglos estructurales entre la CIL y la región amigdalina (Do-Monte et al., 2015; Maren, 2014), y la corteza insular (Hoover & Vertes, 2007; Vertes, 2004).

En cuanto a los mecanismos celulares asociados al proceso de extinción, se reconoce la participación de los receptores NMDA (*N*-metil *D*-aspartato) (Fiorenza, Rosa, Izquierdo, & Myskiw, 2012), así como la activación de proteínas cinasas como la cinasa fosfatidilinositol-3 (PI3K) (Chen et al., 2005; Lin et al., 2001), las cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Lu, Walker, & Davis, 2001), y fosfatasas como la calcineurina (Almeida-Corrêa et al., 2015).

El conocimiento actual entorno a los mecanismos neurobiológicos que subyacen a la extinción, ha experimentado un incremento notable en la última década (Milad & Quirk, 2012), debido entre otras razones a la necesidad de conocer las bases celulares de los desórdenes de ansiedad, fobias y estrés posttraumático (Bowers & Ressler, 2015; Quirk & Mueller, 2008).

### **Neurotrofinas**

La diversidad celular en el SN se origina a partir de la acción concertada de los procesos de proliferación celular, diferenciación, crecimiento, migración, supervivencia y formación de sinapsis. Entre los mensajeros involucrados en la comunicación neuronal que da origen a estos procesos se encuentran ciertas moléculas denominadas factores tróficos, o factores neurotrófico, que son proteínas que controlan la supervivencia, el crecimiento y las capacidades funcionales de poblaciones específicas de neuronas (Escobar, 1994). Diversos hallazgos han reportado la participación de este grupo de proteínas en la modulación de plasticidad sináptica de larga duración (Escobar, Figueroa-Guzmán, & Gómez-Palacio-Schjetnan, 2003; Gómez-Palacio-Schjetnan & Escobar, 2008; Je, Yang, Zhou, & Lu, 2006; Lu, Pang, & Woo, 2005; Messaoudi, Ying, Kanhema, Croll, & Bramham, 2002). En el SNC las neurotrofinas se encuentran expresadas predominantemente en la neocorteza y el hipocampo. Actualmente se sabe que sus niveles de secreción son regulados por la actividad sináptica y que ejercen sus acciones en la eficiencia de la comunicación de las sinapsis tanto en las células presinápticas como en las postsinápticas (Kolarow, Brigadski, & Lessmann, 2007; Lu et al., 2005). La investigación realizada durante las dos décadas pasadas ha revelado que las neurotrofinas regulan casi todos los aspectos del desarrollo de los circuitos neuronales y su funcionamiento, incluyendo la proliferación y la diferenciación, el crecimiento axonal y dendrítico, así como la plasticidad sináptica (Park & Poo, 2013). Los factores neurotróficos o neurotrofinas constituyen una

familia conformada por el factor de crecimiento neuronal (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina-3 (NT3), la neurotrofina-4/5 (NT-4/5), la neurotrofina-6 (NT-6) y la neurotrofina-7 (NT-7) (Nilsson, Fainzilber, Falck, & Ibáñez, 1998).

Inicialmente, las neurotrofinas son sintetizadas como proteínas precursoras (proneurotrofinas), de forma similar a los neuropéptidos y posteriormente son procesadas por diversas enzimas que producen a la proteína madura una vez que han sido liberadas al medio extracelular (Lessmann, Gottmann, & Malsangio, 2003). Cada una de estas proteínas en su forma madura forma un complejo con una proteína gemela (dímero), permitiendo la activación de sus receptores específicos (Chao, 2003). Se ha descrito que existe liberación postsináptica de neurotrofinas como NT-3 y BDNF, la cual es modulada por la CaMKII (Kolarow et al., 2007).

Las neurotrofinas actúan por medio de dos tipos de receptores, los de tirosina cinasa denominados Trk (de alta afinidad con las neurotrofinas maduras) y los p75 (de baja afinidad con las proteínas maduras, pero alta con las inmaduras o precursoras). Las proneurotrofinas actúan como señalizadores moleculares a través de su interacción con el receptor p75, ejerciendo efectos biológicos opuestos a los evocados por las neurotrofinas maduras. De esta manera, la segmentación proteolítica de las proneurotrofinas representa un mecanismo de control que direcciona las acciones de las neurotrofinas (Lu et al., 2005). Los diferentes tipos de receptores Trk identificados hasta el momento, son activados principalmente por uno o varios miembros de esta familia de proteínas. Así, el TrkA actúa como receptor del NGF, el TrkB principalmente para el BDNF y la NT-4/5, y el TrkC para la NT-3 (Chao, 2003).

Existen isoformas de los receptores Trk denominados receptores truncados, que carecen de los residuos de tirosina cinasa. Los receptores truncados son capaces de unirse con sus correspondientes ligandos e incluso se internalizan, pero son incapaces de iniciar los eventos de fosforilación requeridos para la transducción de señales. De esta manera la distribución y concentración membranal de los receptores truncados podría potencialmente modular la actividad de las neurotrofinas restringiendo la disponibilidad de estos factores para interactuar con los receptores completos (Rose et al., 2003). Una característica interesante de las acciones de las neurotrofinas, radica en su capacidad para autorregular su producción así como la de otras proteínas miembros de esta familia. Un ejemplo en

este sentido lo constituye el estudio realizado por Patz y Wahle en el 2004, en dicho estudio se observó que la administración de BDNF origina incrementos en la expresión de BDNF, NGF y NT-3, en tanto que disminuye la expresión de NT-4, en cultivos de neuronas corticales (Patz & Wahle, 2004).

Una vez que las neurotrofinas se unen a su receptor Trk pueden activar tres cascadas metabólicas que incluyen la vía de MAPKs, PI3K-Akt y la vía de la PLC (fosfolipasa C); estas vías de señalización tienen como punto final la activación de síntesis proteínica y las consecuentes modificaciones en la comunicación y la morfología de las sinapsis (Patapoutian & Reichardt, 2001) (Fig. 5).

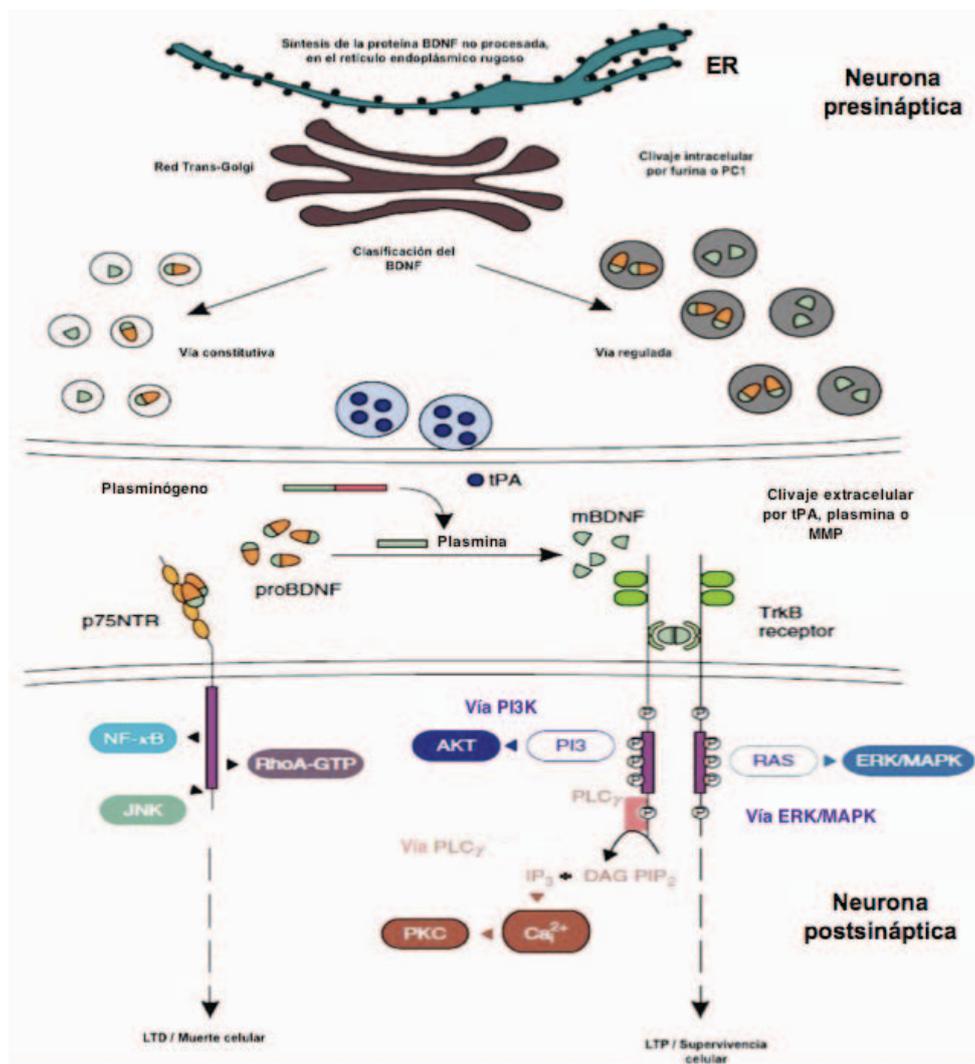


Figura 5. Síntesis, tráfico y señalización de BDNF. El BDNF se sintetiza como una proteína precursora (proBDNF), que se empaqueta en la red trans-Golgi para posteriormente ser secretado en vesículas. Subsecuentemente el BDNF es liberado ya sea de forma constitutiva o regulada. La conversión del proBDNF a su forma madura (mBDNF), se puede llevar a cabo intracelularmente por una furina o por proteínas convertasas, y extracelularmente por tPA/plasmina o metaloproteinasas. El mBDNF se une al receptor TrkB, generando la autofosforilación de residuos de tirosina en el dominio de tirosina cinasa, activando las cascadas de señalización PI3K, ERK/MAPK y PLC. En contraste, el proBDNF se une al receptor p75 activando proteínas como NF-κB, JNK y RhoA. Modificado de Woo et al., (2009).

## **Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF)**

El BDNF es una proteína dimérica cuyo peso molecular es de 27 kDa, y su secreción en forma madura activa preferencialmente a los receptores TrkB, mientras que en su forma inmadura, el proBDNF, se liga al receptor p75, favoreciendo la generación de mecanismos apoptóticos. Se ha observado una alta expresión de esta neurotrofina y de su receptor de alta afinidad, TrkB, en la neocorteza, así como en distintas regiones del sistema nervioso central: corteza piriforme, amígdala, formación hipocampal, entre otras (Yan et al., 1997). Esta neurotrofina se encuentra contenida en vesículas secretoras, presentes en los botones terminales y en las dendritas, principalmente de las neuronas glutamatérgicas, y su secreción se da en forma dependiente de actividad tanto de sitios pre como post sinápticos (Hartmann, Heumann, & Lessmann, 2001). Se conocen dos vías por las cuales ésta neurotrofina es secretada:

- Vía regulada: Implica exocitosis dependiente de  $Ca^{2+}$  de los gránulos secretores. El proBDNF sale de la red trans-Golgi en gránulos secretores inmaduros que contienen una serie de proteínas convertasas. El BDNF maduro es liberado en gránulos secretores dirigiéndose hacia la membrana plasmática, donde se acumulan y eventualmente se liberan por una secreción regulada por la actividad. Esta vía permite a las neurotrofinas controlar la eficiencia sináptica de una forma rápida y específica.
- Vía constitutiva: Emplea un tipo distinto de vesículas que liberan su contenido cuando alcanzan la membrana plasmática. Las proteínas convertasas presentes en la red trans-Golgi pueden escindir la pro-secuencia y el BDNF maduro es direccionado hacia una liberación constitutiva. Esta vía produce un suministro sostenido de neurotrofinas extracelulares, regulando su concentración basal en el espacio extracelular (Lessmann & Brigadski, 2009).

Dentro de los posibles mecanismos que favorecen la secreción de BDNF en forma regulada se encuentran: la activación de los canales de calcio tipo N y la movilización de  $Ca^{2+}$  de sus almacenes internos (Balkowiec et al., 2002; citado por Lu, Christian, & Lu, 2008). De esta forma, el BDNF puede ejercer sus efectos tanto pre como postsinápticamente. Presinápticamente, regula la liberación de glutamato, mientras que postsinápticamente, produce modificaciones y síntesis de receptores a

este neurotransmisor, expresión génica y alteraciones locales en la síntesis de proteínas (Carvalho, Caldeira, Santos, & Duarte, 2008). De hecho, una de las explicaciones por las cuales el BDNF actúa específicamente en las sinapsis activas, es debido a la síntesis local de BDNF y de su receptor de alta afinidad en las dendritas (Righi, Tongiorgi, & Cattaneo, 2000).

El BDNF posee varias características que lo postulan como una de las proteínas sustanciales implicadas en la plasticidad sináptica: su forma de secreción dependiente de la actividad, las regiones del SNC en las cuales tanto la neurotrofina como su receptor TrkB se encuentran altamente concentrados (como en la formación hipocampal y la neocorteza) y su regulación tanto pre como postsináptica que favorece las modificaciones sinápticas, etc.

Aunado a lo anterior, el receptor TrkB se encuentra tanto en la presinapsis como en la postsinapsis; uno de los principales efectos del BDNF en la presinapsis es la facilitar la liberación del neurotransmisor, mientras en la postsinapsis el BDNF incrementa la fosforilación de los receptores NMDA y AMPA. Como anteriormente se mencionó las acciones del BDNF pre y postsinápticas a largo plazo estimulan la síntesis de ARNm y de proteínas a través de la activación de factores de transcripción como es el CREB (Gómez-Palacio Schjetnan & Escobar-Rodríguez, 2007) (Fig. 6).

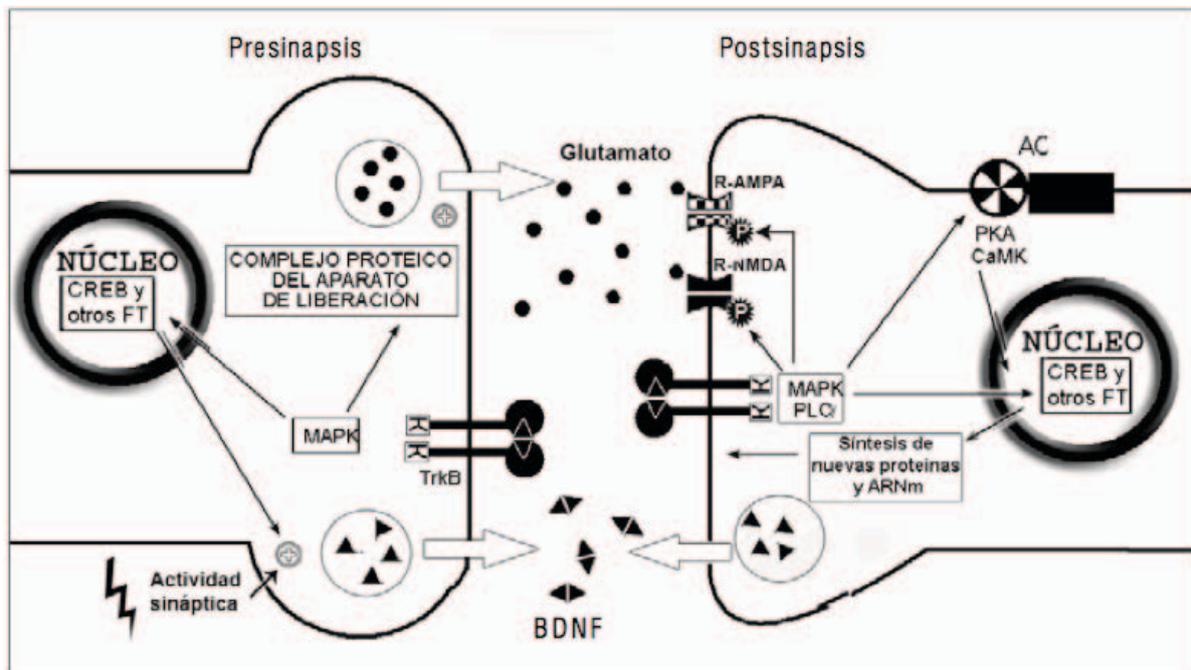


Figura 6. Modelo de las acciones pre y postsinápticas del BDNF durante la plasticidad sináptica. La actividad neuronal incrementa la expresión y liberación de BDNF en los sitios pre y postsinápticos. El BDNF se une a sus receptores TrkB, activando cascadas de señalización entre las que se incluyen tanto las cinasas activadas por mitógenos (MAPK) como la activación de la fosfolipasa C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ). Uno de los principales efectos del BDNF en la presinapsis es la facilitación de la liberación de neurotransmisor. Entre los efectos postsinápticos de esta neurotrofina se encuentran el incremento en la fosforilación (p) de los receptores NMDA (R-NMDA) y AMPA (R-AMPA). Las acciones pre y postsinápticas del BDNF a largo plazo estimulan la síntesis de ARNm y proteínas a través de la activación de factores de transcripción. AC: adenilato ciclasa; CREB: elemento de unión responsable al AMP cíclico; FT: factores de transcripción. Modificado de Gómez-Palacio Schjetnan & Escobar-Rodríguez (2007).

### BDNF y plasticidad sináptica

Como se mencionó anteriormente el BDNF está involucrado en la regulación de la plasticidad sináptica dependiente de la actividad (Carmignoto, Pizzorusso, Tia, & Vicini, 1997). La actividad regula los niveles de secreción de esta neurotrofina y ella a su vez regula tanto la transmisión sináptica como el crecimiento neuronal (McAllister, Katz, & Lo, 1999). La expresión de BDNF en la neocorteza visual experimenta un rápido y significativo incremento debido a la actividad neuronal (Bozzi et al., 1995). Además, la inducción de potenciación a largo plazo (LTP) en el giro dentado hipocampal, incrementa los niveles de ARNm para el BDNF así como para el receptor TrkB (Bramham, Southard, Sarvey, Herkenham, & Brady, 1996). Adicionalmente se ha reportado, que las cepas de ratón carentes del gen que codifica para la expresión del BDNF, exhiben una disminución significativa en la expresión de LTP hipocampal (Korte et al., 1995). En este orden de ideas, se ha

reportado que la administración de BDNF produce incrementos de larga duración en la transmisión sináptica (similares a la LTP) en rebanadas o cultivos neuronales hipocampales procedentes de roedores adultos (Levine, Dreyfus, Black, & Plummer, 1995).

La memoria involucra cambios en las propiedades eléctricas así como alteraciones estructurales en la sinapsis. En virtud de que el BDNF modula ambas expresiones de plasticidad sináptica, esta neurotrofina ha sido considerada como un importante señalizador durante los procesos de aprendizaje y memoria. En este sentido, una serie de investigaciones muestran que el aprendizaje espacial produce incrementos en los niveles de ARNm de BDNF (Kesslak, So, Choi, Cotman, & Gomez-Pinilla, 1998), así como en su receptor TrkB en el hipocampo (Gómez-Pinilla, So, & Kesslak, 2001). Empleando hibridación *in situ*, se han revelado incrementos rápidos y selectivos en la expresión del BDNF en el área CA1 del hipocampo, durante el aprendizaje contextual (Hall, Thomas, & Everitt, 2000). La administración intraventricular de anticuerpos para BDNF, origina decrementos significativos en el desempeño de roedores en el laberinto de agua (Cirulli, Berry, Chiarotti, & Alleva, 2004). De manera similar, en animales en los que se induce el bloqueo de la expresión del gen que codifica para BDNF, se producen decrementos en el desempeño de tareas espaciales dependientes del hipocampo (Johnston & Rose, 2001). Al respecto, Alonso y colaboradores (2002) reportaron que la presencia de BDNF en el hipocampo es esencial para que se lleven a cabo tareas relacionadas con la memoria de corto y largo plazo. La administración intrahipocampal de BDNF incrementa la retención de la memoria en tareas espaciales (Johnston & Rose, 2001). De manera similar, Liu y colaboradores (2004) observaron que la producción de BDNF y de su receptor TrkB, juega un papel crítico en el condicionamiento al miedo. Asimismo estudios realizados en nuestro laboratorio, han mostrado que la administración intracortical de BDNF (en concentraciones capaces de producir incrementos de la eficiencia sináptica), aumenta la retención del condicionamiento de aversión a los sabores (Castillo, Figueroa-Guzmán, & Escobar, 2006). En resumen, esta serie de hallazgos respaldan la idea de que el BDNF participa en los procesos de almacenamiento de información en el sistema nervioso de los seres vivos.

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

La CI es el relevo final de la vía gustativa. Los vertebrados detectamos los sabores por medio de la activación de células quimiorreceptoras, las cuales responden a moléculas o iones que están disueltos en la saliva. Estas células, junto con células basales y de soporte forman las yemas gustativas. Las yemas gustativas son consideradas los órganos sensoriales del sentido del gusto. Tanto en el humano como en la rata, la ubicación de las yemas gustativas dentro de la cavidad oral se observa en pequeñas protuberancias del epitelio de la lengua denominadas papilas. Por su forma, se pueden distinguir tres tipos de papilas gustativas distribuidas en la lengua: circunvaladas, foliadas y fungiformes. Es relevante mencionar que tanto el paladar como la faringe, epiglotis y parte superior del esófago presentan yemas gustativas pero solo las yemas que se encuentran en la lengua están agrupadas en papilas (Fig. 7) (Bear et al., 2007).

Los pares craneales VII (facial), IX (glossofaríngeo), y X (vago) llevan información de las yemas gustativas (Fig. 7). El nervio facial lleva información de las papilas fungiformes que se encuentran en la parte anterior de la lengua, así como de las yemas gustativas localizadas en el paladar y en el conducto nasoincisor. El nervio glossofaríngeo lleva información de las papilas foliadas y circunvaladas que se encuentran en la parte posterior de la lengua, mientras que el nervio vago lleva información de las yemas gustativas de la epiglotis laringe y esófago. Por otra parte, el nervio trigémino inerva la periferia de las yemas gustativas y transmite información somatosensorial, textura y temperatura de los alimentos (Reutter et al., 1993). Los tres nervios, facial, glossofaríngeo y vago, hacen sinapsis en el núcleo del tracto solitario.

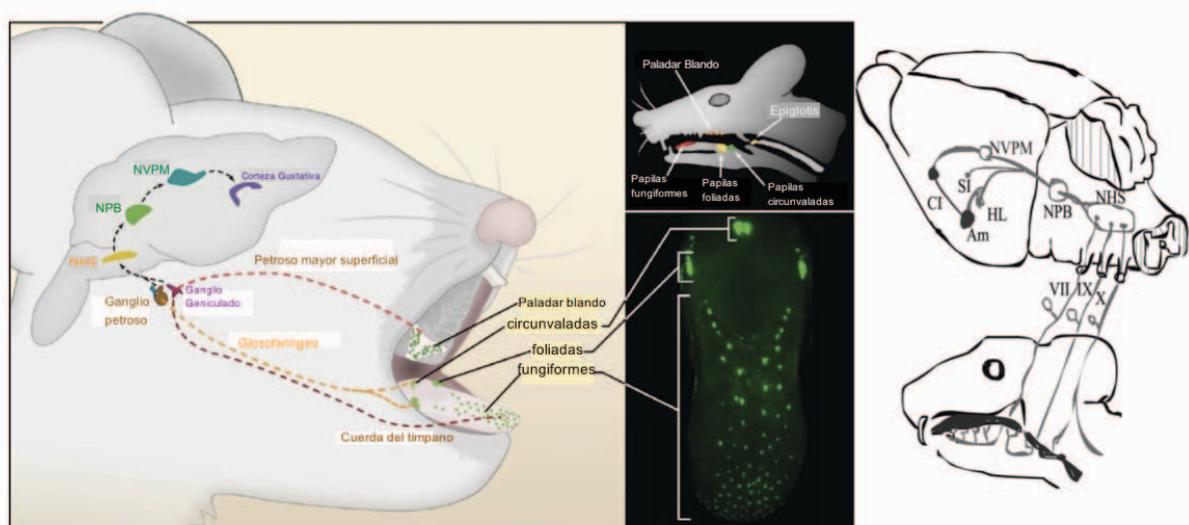


Figura 7 La anatomía del sabor y la vía gustativa en la rata. En la figura de la izquierda se observa la distribución de las papilas gustativas (circunvaladas, foliadas y fungiformes), señaladas también en el panel inferior derecho en la imagen de fluorescencia. Las papilas gustativas en la lengua y el paladar son inervadas por tres nervios aferentes: la cuerda del tímpano, el petroso mayor superficial y el glossofaríngeo, donde la información gustativa es conducida hasta su relevo final en la corteza insular o gustativa. El panel derecho muestra un esquema de la vía gustativa de la rata. (Abreviaturas: VII, nervio facial; IX, nervio glossofaríngeo; X, nervio vago; NHS, núcleo del tracto solitario; NPB, núcleo parabraqueal del puente; NVPM, núcleo ventroposteromedial del tálamo; CI, corteza insular; SI, sustancia innominada; HL, hipotálamo lateral; Am amígdala). Modificado de Bear et al., (2007); Yarmolinsky, Zuker, & Ryba, (2009).

Después de dicho relevo las diferencias entre el sistema gustativo de los humanos y de las ratas se hacen evidentes. En las ratas, el segundo relevo de la vía gustativa se encuentra en el núcleo parabraqueal del puente, en lo que se ha denominado como área gustativa del puente (Norgren & Leonard, 1971). Una vez ahí se reconocen dos rutas: la primera se proyecta hacia estructuras ventrales del cerebro basal como la amígdala, la zona ventral del hipocampo, y la sustancia innominada mientras que la segunda se proyecta hacia el complejo ventrobasal del tálamo, el cual se comunica con la CI agranular (Gerfen & Clavier, 1979) (Fig. 8). En el humano las fibras eferentes provenientes del núcleo del tracto solitario se proyectan al núcleo ventroposteromedial del tálamo en su división parvocelular (Norgren & Leonard, 1973; Rolls, 2015), que a su vez envía sus eferencias a la ínsula anterior y al opérculo frontal, por lo cual estas dos zonas son consideradas como la corteza gustativa primaria en los humanos (Kinomura et al., 1994; Pritchard, Hamilton, Morse, & Norgren, 1986).

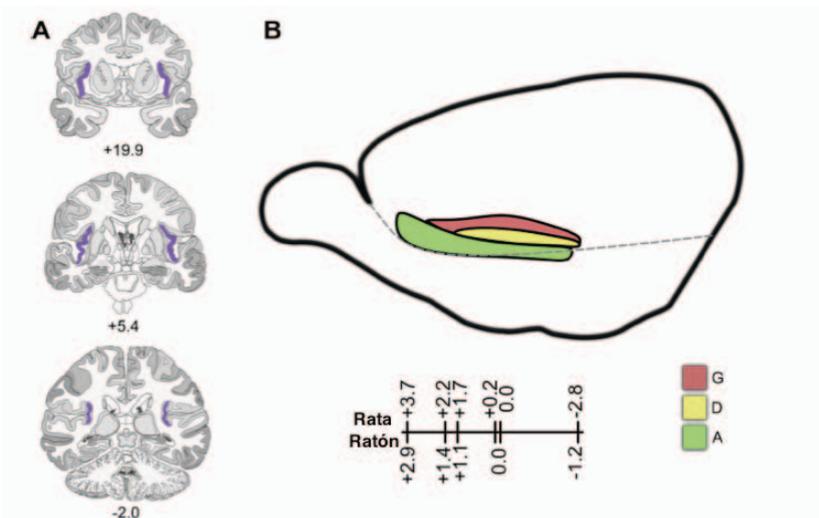


Figura 8. Representación esquemática de la corteza insular en humanos (A), en ratas y ratones (B) a lo largo del surco rinal pueden apreciarse las regiones de la CI: granular (G), disgranular (D) y agranular (A). Modificado de Bermúdez-Rattoni (2014).

Es importante señalar que el núcleo del tracto solitario recibe aferencias del área hepática del vago, así como señales del área postrema a través del torrente sanguíneo estas vías son importantes, ya que transmiten información relacionada con irritación por intoxicación gástrica a la CI (Yamamoto et al., 1992). Por ejemplo, un estudio electrofisiológico demostró la activación de la CI cinco minutos después de la inyección de LiCl (Weiner et al., 1994). También es importante considerar las conexiones recíprocas entre la CI y la amígdala, esta última relacionada con tareas aversivas como el condicionamiento al miedo y la evitación inhibitoria, así como con respuestas emocionales como el miedo y la agresión (LeDoux, 1993; McGaugh, Castellano, & Brioni, 1990).

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

acetilcolina activa a receptores de tipo muscarínico en la CI, que promueven la activación de la PKC, la cual tiene injerencia en la modulación de los receptores NMDA y en la activación de otras cinasas como ERK (Bermúdez-Rattoni et al., 2005; Bermúdez-Rattoni, 2004). Por otro lado, para la formación del trazo de memoria gustativa de tipo aversivo, se ha observado que el malestar gástrico incrementa los niveles de glutamato en la CI debido a la activación de la vía amígdalo-cortical, lo cual promueve la entrada de calcio al interior de las neuronas en dicha corteza, iniciando cambios plásticos dependientes de la actividad (Bermúdez-Rattoni et al., 2005; Bermúdez-Rattoni, 2004). Actualmente, se considera que la conjunción de los mecanismos del trazo gustativo y del trazo aversivo en la CI activan diferentes proteínas relacionadas con la plasticidad como la misma PKC o la PKA, que son parte de una cadena molecular que culmina con la activación de genes de expresión temprana como CREB, los cuales promueven la síntesis de nuevas proteínas relacionadas con el mantenimiento de la memoria del CAS (Bermúdez-Rattoni et al., 2005; Bermúdez-Rattoni, 2004; Yasoshima, Morimoto, & Yamamoto, 2000). De manera interesante, diversas proteínas que se encuentran relacionadas con la formación y el mantenimiento del CAS se encuentran también relacionadas con la expresión de la LTP en la CI, lo cual sugiere una coincidencia de mecanismos entre estos dos fenómenos (Escobar, Alcocer, & Chao, 1998a; Escobar & Bermúdez-Rattoni, 2000; Escobar, Alcocer, & Bermúdez-Rattoni, 2002).

### **Condicionamiento de aversión a los sabores (CAS)**

La supervivencia de un organismo está basada, entre otras cosas, en la capacidad de aprender y recordar que un alimento ingerido fue seguido de un malestar, anticipando de esta forma el potencial dañino de cualquier alimento que tenga atributos similares y evitando su consumo. John García describió por primera vez que las ratas desarrollan aversión a soluciones con sabor dulce cuando éstas son seguidas por la aplicación de rayos gamma (García, Kimeldorf, & Koelling, 1955). En posteriores experimentos del mismo grupo de investigación, el estímulo aversivo utilizado fue el cloruro de litio (LiCl). En este sentido, García y Koelling en 1966, demostraron que una solución con sabor se asocia más fácilmente a la inducción de náusea que a la aplicación de choques eléctricos en las patas, lo cual nos muestra que en este condicionamiento, donde el estímulo condicionado es el

sabor, es importante que el estímulo aversivo sea de tipo visceral (Garcia y Koelling, 1966). A esta conducta de rechazo basada en el aprendizaje se le llamó condicionamiento de aversión a los sabores o CAS. El CAS es un tipo de condicionamiento clásico, donde el sabor sirve como estímulo condicionado y el malestar gástrico como estímulo incondicionado, de modo que un estímulo gustativo adquiere la capacidad de inducir una respuesta condicionada. Los animales pueden aprender el CAS si la solución con sabor es ingerida espontáneamente, pero también presentan el aprendizaje de la tarea cuando el estímulo aversivo es inyectado por vía intraperitoneal o intravenosa (Bradley & Mistretta, 1971; Bures & Buresova, 1989).

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

1. Si un animal consume un alimento con sabor y subsecuentemente sufre malestar gástrico, en los siguientes encuentros con ese sabor el animal evitará o disminuirá drásticamente su consumo (Garcia, Lasiter, Bermúdez-Rattoni, & Deems, 1985).
2. La fuerza de la aversión aprendida está directamente relacionada con la intensidad del sabor y del malestar, y está inversamente relacionada al intervalo entre la presentación del sabor y la inducción de malestar. Este intervalo puede durar horas, a diferencia de otros condicionamientos, en los cuales es necesario que el intervalo entre el estímulo condicionado y la respuesta incondicionada sea de segundos (Domjan, 1985).
3. Los estímulos gustativos se asocian más fácilmente a estímulos gástricos (Garcia y Koelling, 1966).

Numerosos experimentos han demostrado que lesiones bilaterales de la CI deterioran el aprendizaje y la evocación del CAS (Bermúdez-Rattoni et al., 2005; Bermúdez-Rattoni, 2004) sin embargo, estas lesiones en la CI no parecen afectar la percepción del sabor, ya que los animales con lesión en la CI pueden discriminar entre diferentes concentraciones de sacarosa y NaCl (Lasiter, Deems, Oetting, & Garcia, 1985). Estudios electrofisiológicos mediante estimulación gustativa y evocación de señales de la lengua a la corteza insular sugieren que los estímulos gustativos confluyen en la CI (Bermúdez-Rattoni et al., 2005; Bermúdez-Rattoni, 2004; Bernstein & Koh, 2007). A este respecto, estudios electrofisiológicos en los que se evocan señales en la corteza gustativa mediante estimulación lingual

sugieren que el CAS promueve cambios en la actividad de la CI (Grossman, Fontanini, Wieskopf, & Katz, 2008; Yamamoto, Matsuo, Kiyomitsu, & Kitamura, 1989). De manera similar, se ha reportado que el CAS es capaz de producir cambios en la actividad de genes de expresión temprana como c-fos (Bernstein & Koh, 2007) e incluso modifica los mapas sensoriales de la CI en ratas (Accolla & Carleton, 2008). Además, la CI se ha visto involucrada también en otras tareas de aprendizaje de tipo aversivo, como la evitación inhibitoria (Bermúdez-Rattoni & McGaugh, 1991; Bermúdez-Rattoni, 2004; 2014; Escobar, Fernández, Guevara-Aguilar, & Bermúdez-Rattoni, 1989).

En este contexto Ma y colaboradores (2011), han reportado que los niveles de BDNF endógeno experimentan incrementos tanto en la CI como en la amígdala central (AC) durante la adquisición y consolidación del CAS (Fig. 9).

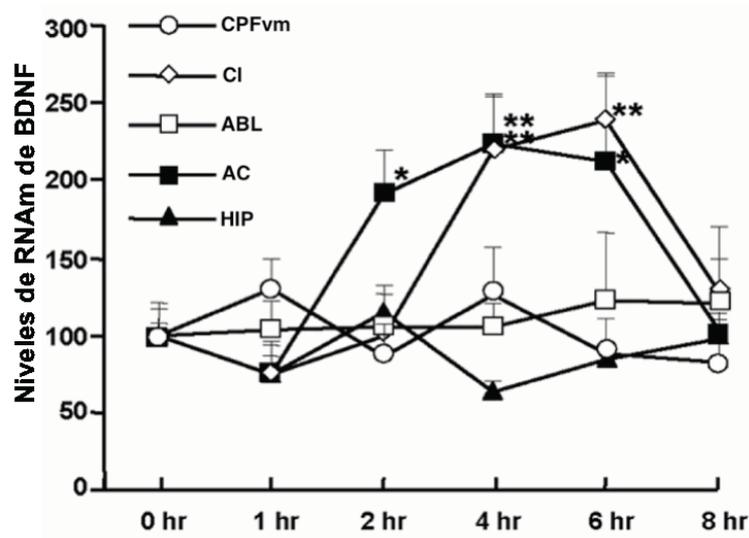


Figura 9. Cambios espacio temporales de la expresión endógena de BDNF posterior a la adquisición del CAS. Se muestran los cambios temporales de la expresión de BDNF en la corteza prefrontal ventromedial (CPFvm), corteza insular (CI), amígdala basolateral (ABL), amígdala central (AC) e hipocampo (HIP). Modificado de Ma et al., (2011).

### Extinción del CAS

La extinción experimental del CAS es un procedimiento que se realiza después de la adquisición de este condicionamiento, donde se presenta sólo el estímulo condicionado en repetidas ocasiones sin asociarlo con el estímulo incondicionado. Como resultado se obtiene una asociación entre el estímulo condicionado y la ausencia del estímulo incondicionado (Bouton, 2004).

Conductualmente, la extinción se observa como la disminución de la respuesta condicionada (aversión al sabor) (Núñez-Jaramillo, Ramírez-Lugo, Herrera-Morales, & Miranda, 2010). Al respecto, se sabe que el CAS presenta resistencia a la extinción, así como que tras la extinción de esta tarea el sabor asociado cambia su representación cortical (Accolla & Carleton, 2008; Berman et al., 2003; Casa & Lubow, 2000). Asimismo, se ha demostrado que la extinción del CAS no elimina el trazo original de la memoria, ya que es posible restablecer la aversión al sabor por medio de una sesión de reaprendizaje (Berman et al., 2003) (Fig. 10). Esto sugiere que la extinción del CAS es un proceso activo de aprendizaje que requiere de entrenamiento para desarrollarse, así como de un proceso de consolidación dependiente de síntesis de nuevas proteínas en la CI (Berman & Dudai, 2001; Garcia-Delatorre, Rodríguez-Ortiz, Balderas, & Bermúdez-Rattoni, 2010), la ABL (Bahar, Dorfman, & Dudai, 2004) y la CIL (Akirav et al., 2006) para su persistencia.

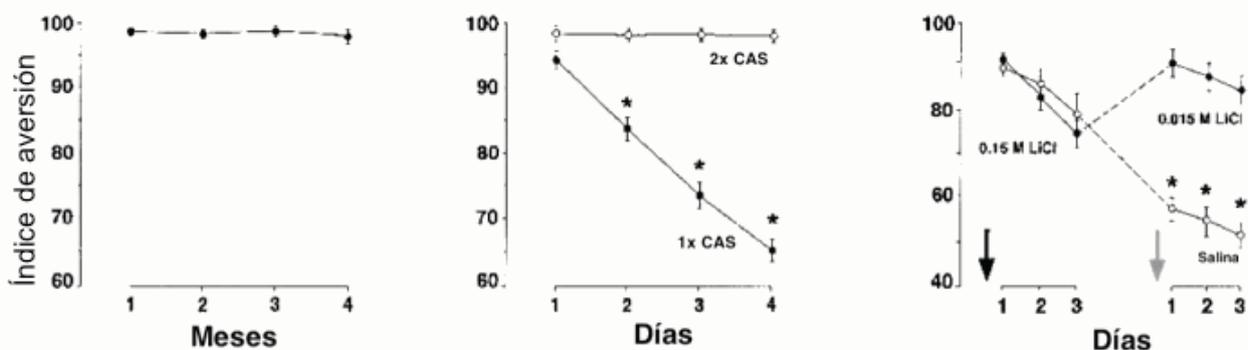


Figura 10. La extinción del CAS es dependiente del tiempo y de la intensidad del estímulo incondicionado. La gráfica de la izquierda muestra la progresión de pruebas de memoria del CAS, practicadas de 1 a 4 meses, en grupos independientes. La gráfica del centro muestra la extinción del CAS tras recibir una (1X CAS) o dos (2X CAS) sesiones de adquisición en dos grupos. La gráfica de la derecha muestra la extinción de dos grupos que adquieren el CAS a una concentración de LiCl 0.15 M (flecha negra), posteriormente se llevó a cabo una sesión de reaprendizaje (flecha gris) en la que uno de los grupos recibió una concentración menor de LiCl (0.015 M), mientras que el otro grupo recibió solución salina. Modificado de Berman et al., (2003).

Se han reportado diferencias entre los mecanismos celulares que sustentan la consolidación de una memoria y los involucrados en la extinción de la misma. Así, por ejemplo, los receptores muscarínicos, los  $\beta$  adrenérgicos, las MAPK y la síntesis de nuevas proteínas son esenciales para la consolidación del CAS; mientras que la extinción es independiente tanto de receptores muscarínicos como de MAPK (Berman et al., 2003), en tanto que requiere de la fosforilación de PI3K en la CI (Slouzkey, Rosenblum, & Maroun, 2013). Asimismo, la inhibición de la proteína cinasa A (PKA) en la ABL, fortalece la extinción de la aversión (Koh & Bernstein,

2003). En este orden de ideas, se conoce que para la consolidación del CAS se requiere de la disminución de la calcineurina (CaN) y del aumento en la actividad del factor de transcripción Zif268 en la amígdala, mientras que durante la extinción se prescinde de ambos eventos (Baumgärtel et al., 2008). Este conjunto de resultados sugieren que los mecanismos moleculares que subyacen a la extinción difieren de los requeridos durante el aprendizaje original.

Durante la extinción del CAS se presentan cambios en la estructura sináptica, que son dependientes de la remodelación de los filamentos de actina en la CIL (Bi et al., 2015). Estos cambios son mediados por ADF (actin depolymerizing factor)/cofilina y conllevan incrementos en el tráfico de receptores de glutamato de tipo AMPA (Bernstein & Bamberg, 2010; Wang et al., 2013). Por otra parte, se ha reportado que la administración de D-cycloserine (DCS) un agonista parcial al receptor de glutamato de tipo NMDA en la ABL revierte el bloqueo en la extinción del CAS inducido ya sea por la administración de muscimol (Akirav, 2007) o por la exposición a una condición de estrés (Akirav, Segev, Motanis, & Maroun, 2009). Asimismo, se ha reportado que la administración exógena de glucocorticoides durante el CAS interfiere con la extinción de esta tarea (Kim, Kim, Kim, Lee, & Jahng, 2014), este efecto se debe en parte a que los glucocorticoides suprimen la actividad de los receptores NMDA (Zhang et al., 2012).

Por otra parte, se conoce que el sistema endocannabinoide participa en la extinción del CAS, puesto que la administración de un antagonista al receptor de tipo 1 (CB1) en la CI obstruye la extinción de esta tarea (Kobilo, Hazvi, & Dudai, 2007). En este sentido resulta pertinente considerar la interacción del sistema de endocannabinoides con la mancuerna BDNF/TrkB recientemente descrita (Andero & Ressler, 2012; Fitzgerald, Seemann, & Maren, 2014).

Shehadi y Maroun reportan que la estimulación de baja frecuencia en la CIL facilita la extinción del CAS (Shehadi & Maroun, 2013). A este respecto, conviene recordar que la red de conexiones activada durante este condicionamiento involucra la participación de la ABL, la CI y la CIL (Hoover & Vertes, 2007; Uematsu, Kitamura, Iwatsuki, Uneyama, & Tsurugizawa, 2014; Vertes, 2004). Recientemente se ha documentado la participación del BDNF durante la extinción del CAS. En este sentido, Xin y colaboradores demuestran que la extinción del CAS origina incrementos en los niveles de ARNm que codifica para BDNF así como de la proteína misma en la CIL y la ABL (Xin et al., 2014) (Fig. 11). Por su parte, Rosas-

Vidal y colaboradores demuestran que la administración de BDNF en la CIL un día previo al inicio de la extinción del condicionamiento al miedo, induce la extinción de esta tarea. Este efecto se presenta incluso cuando se interpone una demora de doce días entre la adquisición de la tarea y la administración de BDNF (Rosas-Vidal, Do-Monte, Sotres-Bayon, & Quirk, 2014) (Fig. 12).

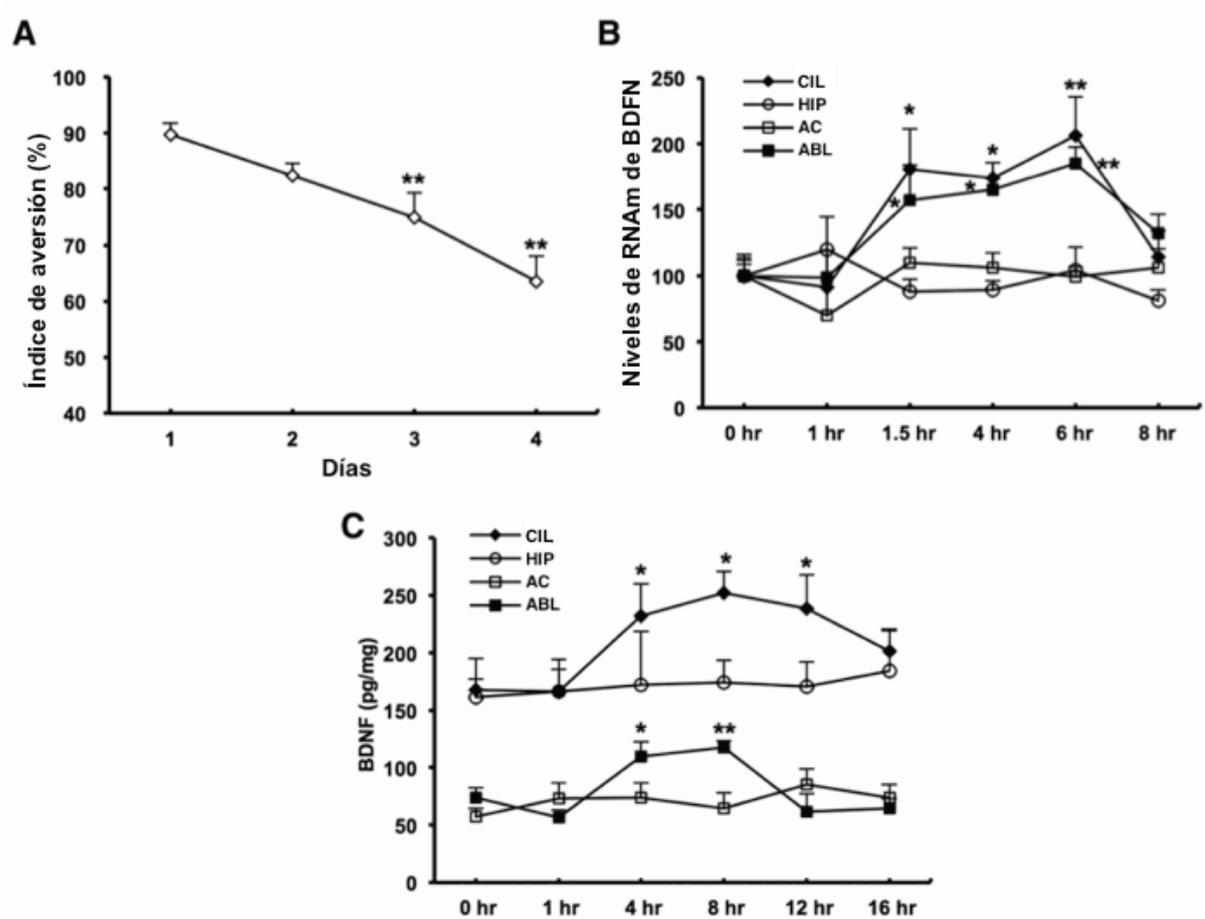


Figura 11. Regulación espacio temporal de la expresión de BDNF durante la extinción del CAS. En la gráfica A se muestra la curva de extinción del CAS, mientras en la figura B se presentan los cambios espacio temporales en los niveles del ARNm de BDNF. En la gráfica C, se observan los cambios espacio temporales de los niveles proteicos de BDNF. CIL: corteza infralímbica; HIP: hipocampo; AC: amígdala central; ABL: amígdala basolateral. Modificado de Xin et al., (2014).

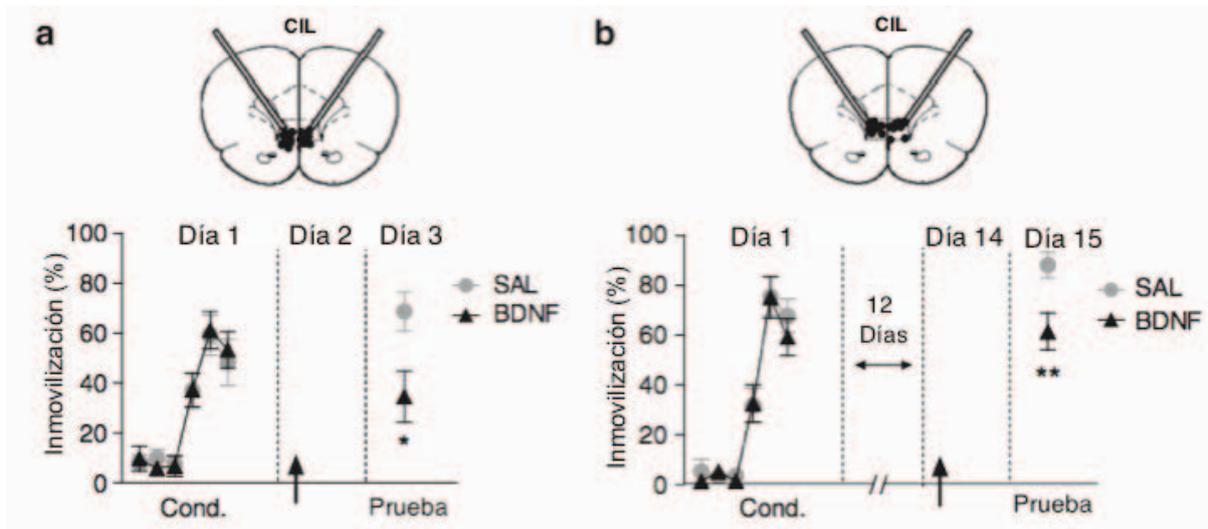


Figura 12. La administración de BDNF en la CIL promueve la extinción del condicionamiento al miedo. En (a) se muestran los cambios que induce la administración de BDNF un día previo a la sesión de extinción, mientras en (b) se muestran los cambios que induce la administración de BDNF efectuada con una demora de 12 días tras el condicionamiento. Modificado de Rosas-Vidal et al., (2014).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que la estimulación tetánica de la amígdala basolateral induce potenciación de largo plazo en la CI de ratas adultas, de manera dependiente de los receptores NMDA (Escobar, Alcocer, & Chao, 1998a). Se observó asimismo que la administración intracortical de antagonistas de los receptores NMDA, deteriora la adquisición del CAS (Escobar, Chao, & Bermúdez-Rattoni, 1998b). Más tarde, se demostró que la inducción de LTP en la proyección de la amígdala basolateral a la CI, previa al entrenamiento del CAS modifica la extinción de esta tarea (Escobar & Bermúdez-Rattoni, 2000). Aunado a lo anterior, se ha demostrado que la administración intracortical de BDNF produce un incremento prolongado de la eficiencia sináptica en el patrón de comunicación del núcleo basolateral amigdalino a la CI, similar al obtenido tras la estimulación tetánica en este área (Escobar, Figueroa-Guzmán, & Gómez-Palacio-Schjetnan, 2003). Asimismo, se ha observado que la administración de BDNF en la CI modifica la extinción del CAS (Castillo et al., 2006), y que la administración de BDNF es capaz de revertir los efectos de la anisomicina (un inhibidor de la síntesis proteínica) sobre la consolidación del CAS (Martínez-Moreno, Rodríguez-Durán, & Escobar, 2011; Moguel-González, Gómez-Palacio-Schjetnan, & Escobar, 2008). Paralelamente, algunas investigaciones comienzan a explorar la participación del

BDNF en el proceso de extinción (Kirtley & Thomas, 2010; Lu, Christian, & Lu, 2008).

En este contexto algunos reportes han mostrado la participación del BDNF en las cortezas CIL y prefrontal durante la extinción del condicionamiento al miedo (Bredy et al., 2007; Peters, Dieppa-Perea, Melendez, & Quirk, 2010). En el presente trabajo se analizó la participación de esta neurotrofina en la corteza insular durante el proceso de extinción del condicionamiento de aversión a los sabores.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Analizar la participación del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en el proceso de extinción del condicionamiento de aversión a los sabores (CAS), tarea conductual aversiva, que depende de la integridad de la corteza insular. Explorando así, parte de los mecanismos celulares que subyacen al proceso de extinción en la neocorteza cerebral.

### **Objetivos particulares**

1. Determinar el efecto de la administración aguda de BDNF en la corteza insular durante la extinción del CAS
2. Dilucidar si los efectos de la administración de BDNF en la corteza insular en la extinción del CAS requieren del primer ensayo de extinción
3. Descartar si la administración de BDNF en la corteza insular interfiere con el trazo original de memoria.

## **PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

### **Sujetos**

Para el presente estudio se emplearon 103 ratas macho de la cepa Wistar con peso de 350-380 g, que fueron alojados en cajas individuales de policarbonato, con un ciclo de luz-obscuridad 12h/12h, iniciándose a las 19:00 h y finalizando a las 7:00 h, a una temperatura promedio de 21°C, y con comida y agua ad libitum (excepto en las fases experimentales que especifiquen lo contrario). El protocolo diseñado para el presente estudio se realizó conforme a las normas internacionales

para el manejo y uso de animales de experimentación establecidas por la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO- 1999).

### **Implantación de cánulas en la corteza insular**

El proceso quirúrgico de los sujetos se llevó a cabo utilizando procedimientos estereotáxicos convencionales y consistió en la implantación bilateral de cánulas guía de acero inoxidable de 1 cm de largo y .022 pulgadas de calibre, bajo el efecto de anestesia con pentobarbital (Nembutal) 50mg/kg i.p. Las coordenadas empleadas fueron AP= +1.2 mm; ML=  $\pm$  5.5 mm; DV= -3 mm (Paxinos & Watson, 2014). El extremo inferior de la cánula fue colocado 2 mm por encima de la CI. Ambas cánulas fueron fijadas al cráneo usando acrílico dental de secado rápido. Un estilete de alambre de acero inoxidable se colocó en el interior de las cánulas con el fin de proteger la luz de obstrucciones (Fig. 13).

### **Administración de fármacos**

Los grupos canulados fueron microinfundidos bilateral e intraparenquimamente en la CI. Para todos los grupos, las administraciones fueron efectuadas con microinyectores contruidos con agujas dentales de calibre 30. Las puntas de los microinyectores fueron introducidos 2 mm por debajo de la posición de las cánulas, alcanzando la CI. Los microinyectores fueron conectados a través de tubos de polietileno a una jeringa Hamilton de 10  $\mu$ l. Las microinyecciones fueron dosificadas mediante una bomba de microadministración (Carnegie Medicin, MA), a una velocidad de flujo de 1  $\mu$ l por minuto. Una vez inyectado el volumen total de la solución administrada, los microinyectores permanecieron al interior de la cánula durante un minuto más, con el fin de asegurar la adecuada difusión de la solución en el tejido.

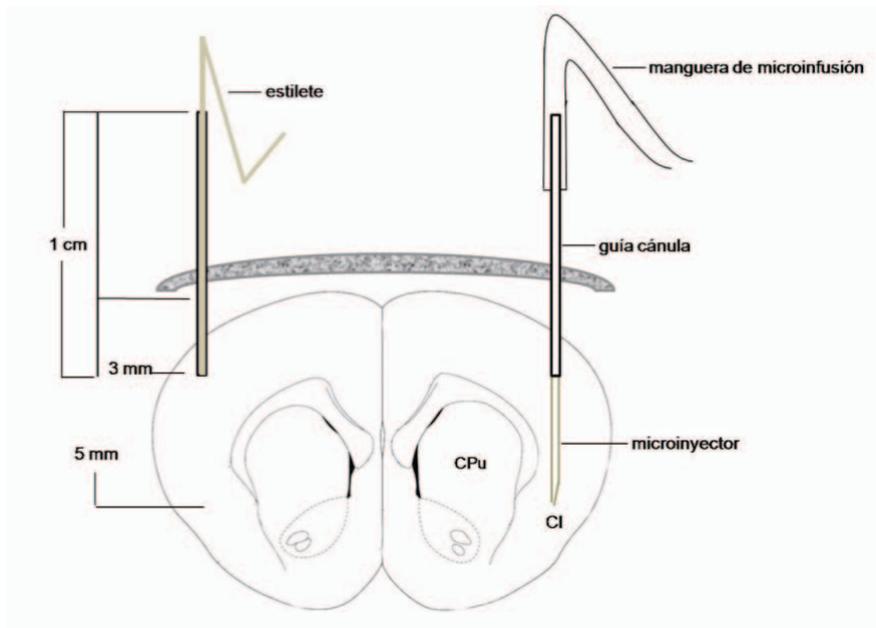


Figura 13. Esquema que muestra la posición de las cánulas guía así como los microinyectores en el parénquima cerebral. Abreviaturas: CI, corteza insular; CPu, caudado-putamen.

### Condicionamiento de aversión a los sabores (CAS)

Al inicio del entrenamiento en el CAS, los animales fueron privados de agua por 24 horas. Posteriormente fueron entrenados para beber agua dos veces al día (10:00 y 18:00 horas) durante 10 minutos, en un periodo de tres días durante los cuales se estableció la línea base de consumo. En el día de la adquisición los animales fueron privados de alimento y el agua fue sustituida por un sabor novedoso, solución de sacarina al 0.1% (Sigma, WI). Tras 10 minutos, se administró una dosis intraperitoneal de cloruro de litio (0.2 M; 9.37 ml/Kg) con el fin de inducir malestar gástrico. Tras la sesión de adquisición, se proporcionó nuevamente agua dos veces al día con el fin de restablecer la línea base de consumo. Una vez restablecida la línea base, el agua fue sustituida nuevamente por la solución de sacarina al 0.1% durante la sesión de prueba. Con el fin de analizar la participación del BDNF en la extinción del CAS, se llevaron a cabo nueve sesiones de extinción para todos los grupos. Con el fin de dilucidar si la administración de BDNF en la CI, interfiere con el trazo de memoria original, durante la novena sesión de extinción se efectuó la readquisición (rADQ) del CAS en la que se administró cloruro de litio en una concentración menor a la empleada originalmente en la sesión de adquisición (0.075 M; (Berman et al., 2003; Miranda, Ferreira, Ramirez-Lugo, & Bermudez-Rattoni, 2002). Tras la sesión de rADQ, se efectuaron 4 sesiones de extinción adicionales.

## **Histoquímica de Nissl**

Con el fin de verificar la posición exacta de las guías cánula en el cerebro de los animales, se empleó la tinción de Nissl. Una vez finalizada la fase conductual, los animales fueron sacrificados mediante una sobredosis del anestésico pentobarbital. Posteriormente, los animales fueron perfundidos transcardialmente con 400 ml de solución salina al 9% (pH 7.4), seguido por 400 ml de paraformaldehído (4% / glutaraldehído 0.2%) y amortiguador de fosfatos al 0.1M con pH 7.4. El periodo de exposición a los fijadores fue de 30 minutos. Los cerebros fueron transferidos a una solución de sucrosa al 30% en PBS 0.1M (pH 7.4) a 4°C durante 48 horas. Secciones coronales de 40  $\mu$ m fueron colectadas en amortiguador de fosfatos tras su obtención por microtomo de congelación (LEICA RM 2000R). Las muestras fueron teñidas con violeta de cresilo y examinadas en un microscopio de luz.

## **Análisis de resultados**

El análisis de los datos derivados de los experimentos conductuales se efectuó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas y la prueba post-hoc de Fisher.

## **DESCRIPCIÓN DE LAS FASES EXPERIMENTALES**

### **Fase 1**

Con el fin de evaluar el efecto de la administración de BDNF en la CI durante la extinción del CAS, los grupos experimentales fueron divididos de la siguiente manera:

1. Grupo BDNF (n=10), el cual recibió una administración intracortical de BDNF (2  $\mu$ g/2  $\mu$ l/hemisferio) (Escobar et al., 2003; Moguel-González et al., 2008) una hora antes de la primera sesión de extinción del CAS.
2. Grupo BDNF+K252a (n=9) el cual recibió una administración intracortical de la combinación de BDNF con un inhibidor de los receptores Trk (K252a) (2  $\mu$ g de BDNF/2  $\mu$ l de K252a 20  $\mu$ M/ hemisferio) (Castillo et al., 2006; Castillo & Escobar, 2011) una hora antes de la sesión de extinción.

3. Grupo Citocromo C (CyT-C, n=8), el cual recibió una administración intracortical de Citocromo C (2  $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$  hemisferio; (Castillo et al., 2006; Castillo & Escobar, 2011), una hora antes de la primera sesión de extinción del CAS. Este grupo se empleó como control proteínico.

4. Grupo PBS (n=10), el cual recibió una administración del vehículo de BDNF (PBS 2  $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$ /hemisferio; (Castillo et al., 2006; Castillo & Escobar, 2011) en la corteza insular una hora antes de la primera sesión de extinción del CAS.

5. Grupo control intacto (CON, n=10), el cual se entrenó en el CAS, sin ninguna administración farmacológica.

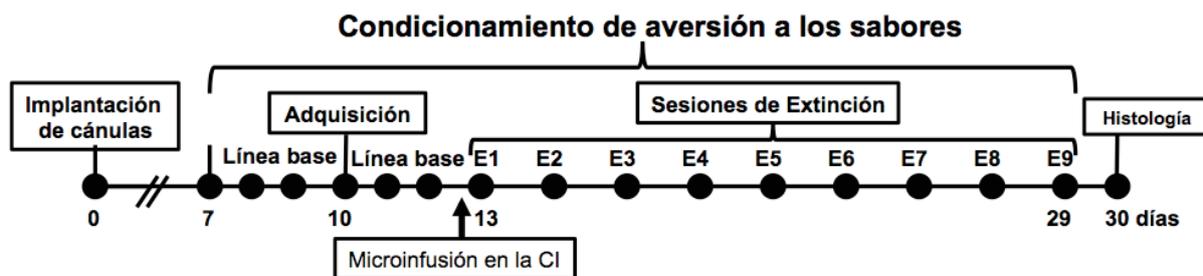


Figura 14. Diagrama de flujo correspondiente a la fase experimental 1.

## Fase 2

Con el fin de dilucidar si los efectos de la administración de BDNF en la CI durante la extinción del CAS requieren del primer ensayo de extinción, los grupos experimentales fueron divididos de la siguiente manera:

1.- Grupo BDNF25-3d (n=9), el cual recibió una administración intracortical de BDNF (2  $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$ /hemisferio) (Escobar et al., 2003; Moguel-González et al., 2008), 25 horas antes de la primera sesión de extinción del CAS y tres días después de la sesión de adquisición. Una hora después de la administración se permitió a los animales beber agua en sustitución de la sacarina.

2.- Grupo PBS25-3d (n=8), el cual en condiciones similares al grupo BDNF25-3d recibió una administración intracortical del vehículo de BDNF (PBS 2  $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$ /hemisferio) (Castillo et al., 2006; Castillo y Escobar, 2011).

Con el objetivo de descartar efectos tardíos sobre la consolidación de la memoria original, se estableció una ventana temporal de 10 días antes de iniciar la extinción, empleando dos grupos adicionales a saber:

1.- Grupo BDNF25-10d (n=8), el cual recibió una administración intracortical de BDNF (2  $\mu$ g/2  $\mu$ l/hemisferio), 25 horas antes de la primera sesión de extinción del CAS y diez días después de la sesión de adquisición. Una hora después de la administración se permitió a los animales beber agua en sustitución de la sacarina.

2.- Grupo PBS25-10d (n=5), el cual en condiciones similares al grupo BDNF25-10d, recibió una administración intracortical del vehículo de BDNF (PBS 2  $\mu$ g/2  $\mu$ l/hemisferio).

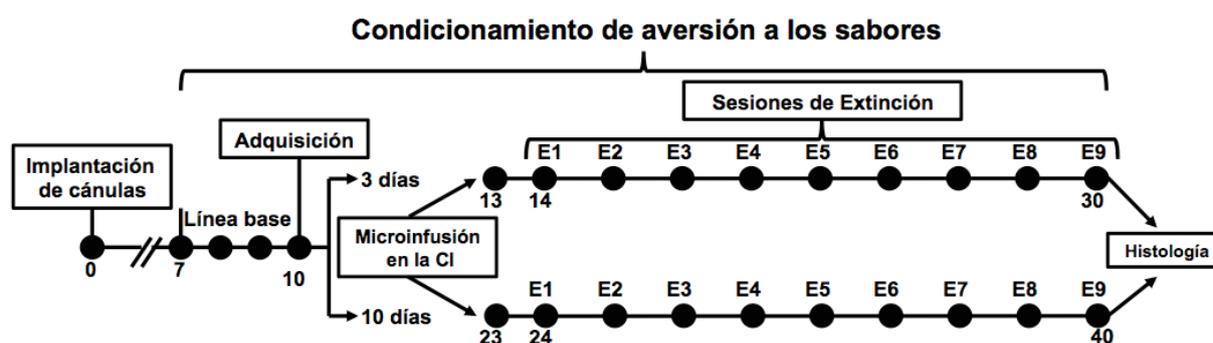


Figura 15. Diagrama de flujo correspondiente a la fase experimental 2.

### Fase 3

En esta fase experimental se determinó si la administración de BDNF en CI interfiere con el trazo original de memoria, por lo tanto los grupos experimentales fueron divididos de la siguiente forma:

1.- Grupo BDNF25+REA (n=10), el cual en condiciones similares al grupo BDNF25-3d recibió una administración intracortical de BDNF (2  $\mu$ g/2  $\mu$ l/hemisferio), 25 horas antes del ensayo de extinción. Durante la novena sesión de extinción los animales recibieron 7.5 ml/Kg i. p. de una solución de LiCl 0.075 M diez minutos después del consumo de sacarina (Berman et al., 2003; Miranda et al., 2002) con el fin de explorar la readquisición del condicionamiento. Cuatro sesiones de extinción adicionales permitieron extinguir la conducta readquirida.

2.- Grupo PBS25+REA (n=8), el cual en condiciones similares al grupo BDNF25+REA recibió una administración intracortical del vehículo de BDNF (PBS 2  $\mu$ g/2  $\mu$ l/hemisferio).

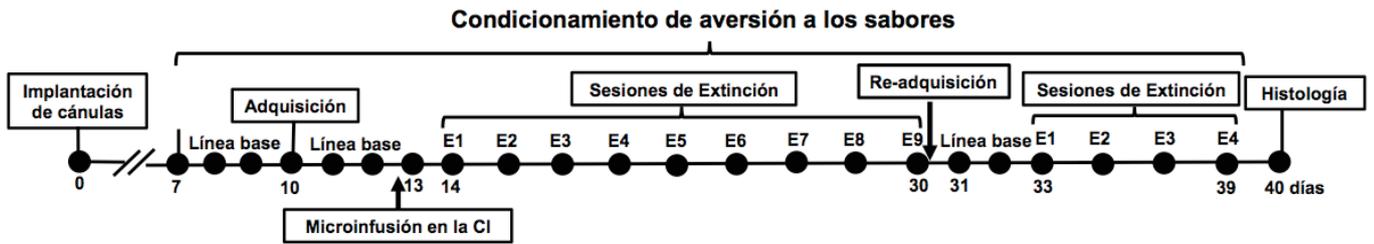


Figura 16. Diagrama de flujo correspondiente a la fase experimental 3.

Con el objetivo de replicar los resultados de reportes previos (Berman et al., 2003; Miranda et al., 2002; Wang et al., 2012), en los que se muestra que una baja concentración de cloruro de litio (0.075M) induce una menor aversión al sabor, se empleó un grupo adicional a saber:

1.- Grupo control intacto (CAS-075, n=8). El cual fue entrenado en el CAS empleando durante la sesión de adquisición una dosis intraperitoneal de LiCl 0.075 M; 9.37 ml/Kg i.p. a fin de inducir el malestar gástrico.

## RESULTADOS

### Histológicos

En la figura 17 se muestra una imagen representativa de la adecuada posición de los microinyectores en la corteza insular. Cabe mencionar que los animales que presentaron una posición inadecuada de las cánulas fueron excluidos del análisis experimental.

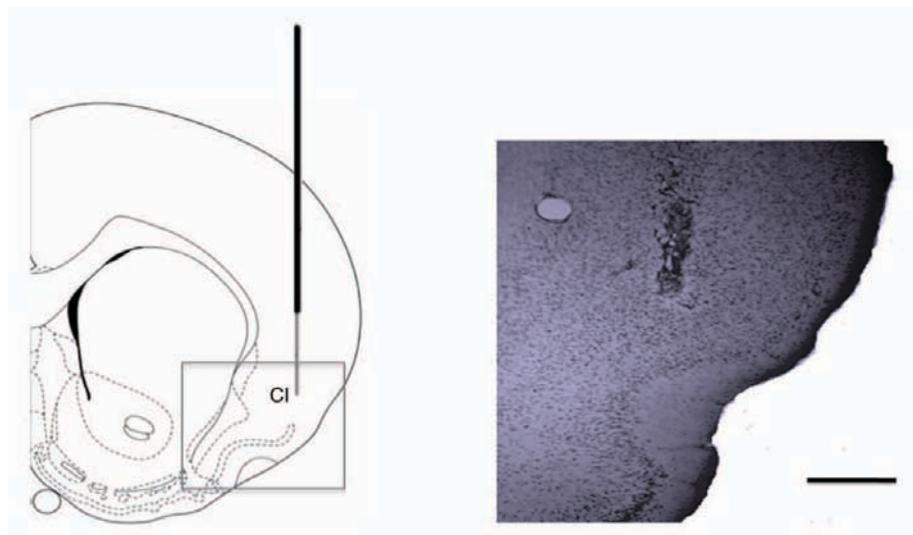


Figura 17. Esquema que muestra la posición de las cánulas guía utilizadas para la administración de los fármacos y fotomicrografía de un corte coronal en la que se muestra la punta de un microinyector. Abreviatura: CI, corteza insular. Barra de escala: 1 mm.

## Fase 1. La administración de BDNF en la CI promueve la extinción del CAS

No se observaron diferencias significativas entre los grupos durante el consumo basal de agua (línea base) ni durante el consumo de sacarina durante la sesión de adquisición del CAS. Los promedios del consumo de agua, fueron los siguientes ( $\bar{X} \pm E.S.$ ):  $14.7 \pm 0.30$ ,  $15.3 \pm 0.40$ ,  $14.9 \pm 0.16$ ,  $15.08 \pm 0.17$  y  $15.6 \pm 0.05$  para los grupos BDNF, K252a+BDNF, PBS, CyT-C y CON, respectivamente (figura 18). En tanto que los promedios de consumo de sacarina durante la sesión de adquisición fueron los siguientes ( $\bar{X} \pm E.S.$ ):  $16.4 \pm 0.33$ ,  $16.2 \pm 0.32$ ,  $15.4 \pm 0.49$ ,  $15.3 \pm 0.56$  y  $15 \pm 0.49$  para los grupos BDNF, K252a+BDNF, PBS, CyT-C y CON, respectivamente, como se muestra en la figura 19.

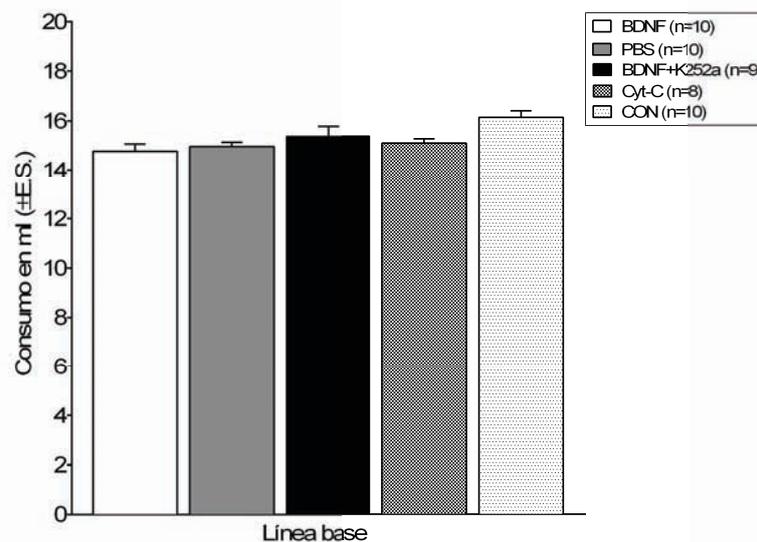


Figura 18. Promedio del consumo de agua durante la línea base entre los diferentes grupos.

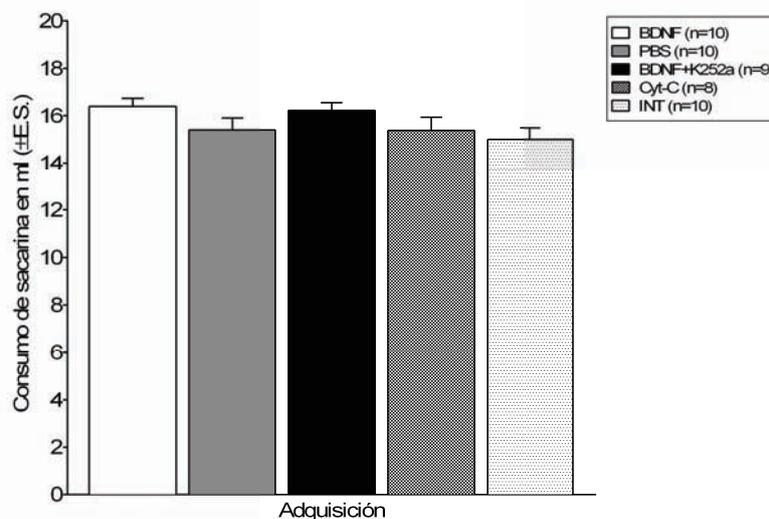


Figura 19. Promedio de consumo de sacarina durante la sesión de adquisición entre los diferentes grupos.

El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre los grupos durante las sesiones de extinción  $F_{(4,42)}= 44.88$ ,  $p<0.001$ . El análisis post-hoc muestra que el grupo de BDNF presenta diferencias significativas de la primera a la sexta sesión de extinción ( $p<0.001$ ) con respecto al resto de los grupos (Fig. 20). Estos resultados revelan que la administración intracortical de BDNF en la CI efectuada una hora previa a la primera sesión de extinción, promueve la extinción del CAS. Dicho efecto es bloqueado cuando esta neurotrofina es administrada en combinación con un inhibidor de los receptores Trk (K252a), sugiriendo que el efecto de la administración de BDNF en la CI sobre la extinción del CAS es mediado por la activación de sus receptores de alta afinidad.

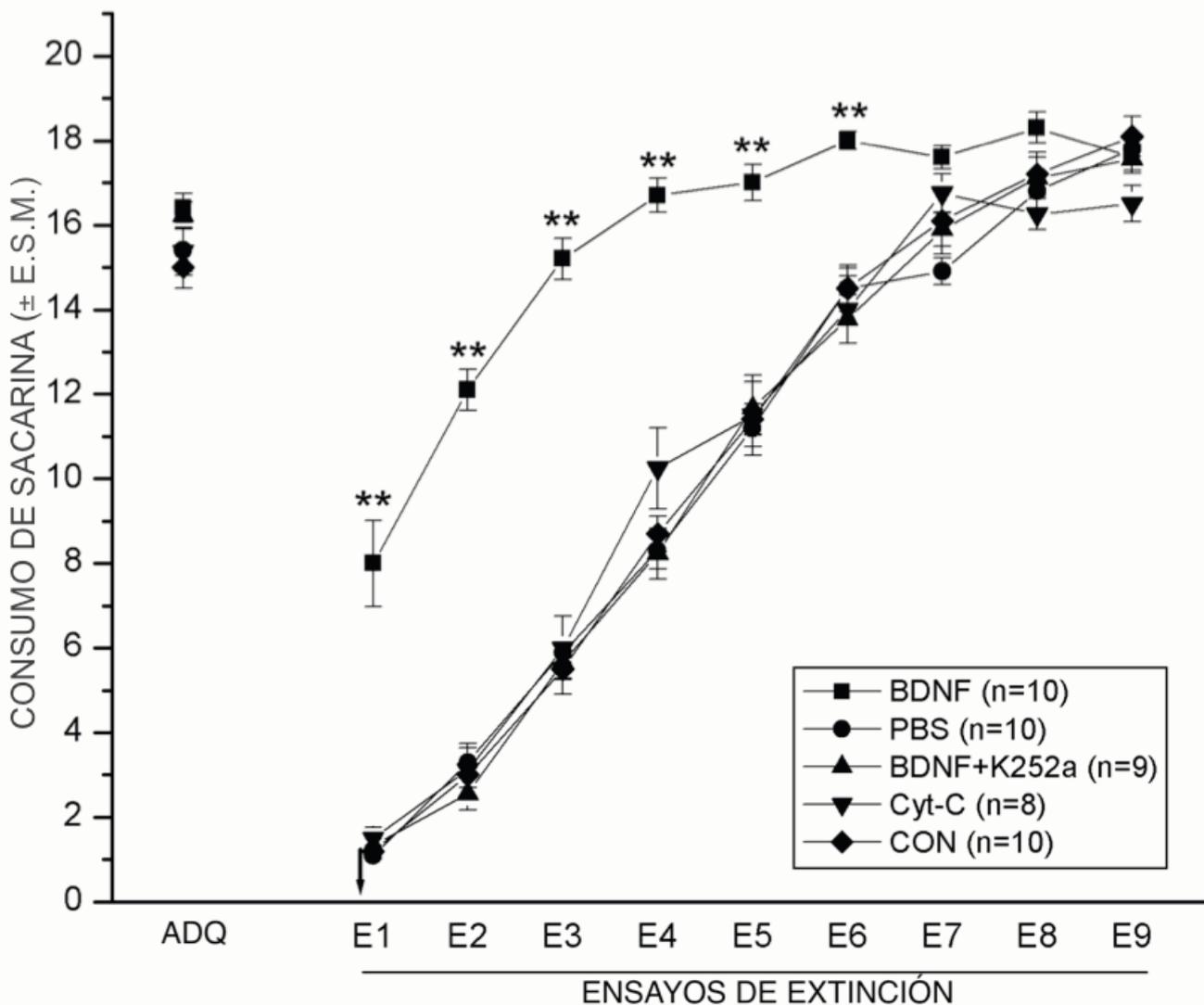


Figura 20. **La administración de BDNF en la CI promueve la extinción del CAS.** En la figura se muestra la sesión de adquisición (ADQ) y los nueve ensayos de extinción (E1 a E9) en los grupos: PBS, BDNF, Cyt-C, BDNF+K252a y CON.  $** (p<0.01)$ . La flecha indica el momento de la administración de BDNF en la CI una hora antes de la primera sesión de extinción.

## FASE 2. La administración de BDNF en la CI promueve la extinción del CAS sin requerir del ensayo de extinción

No se presentaron diferencias significativas entre los grupos durante el consumo de agua (línea base) ni durante el consumo de sacarina durante la sesión de adquisición del CAS. Los promedios de consumo de agua fueron los siguientes ( $\bar{X} \pm E.S.$ ):  $16.1 \pm 1.2$ ,  $16.7 \pm 0.8$ ,  $16.6 \pm 0.7$  y  $15.9 \pm 0.7$  para los grupos BDNF25-3d, PBS25-3d, BDNF25-10d y PBS25-10d respectivamente (Fig. 21). Mientras los promedios del consumo de sacarina durante la adquisición fueron los siguientes ( $\bar{X} \pm E.S.$ ):  $18 \pm 0.2$  y  $17.6 \pm 0.6$ ,  $15.6 \pm 0.9$  y  $16.4 \pm 0.4$  para los grupos BDNF25-3d, PBS25-3d, BDNF25-10d y PBS25-10d respectivamente, como se muestra en la figura 22.

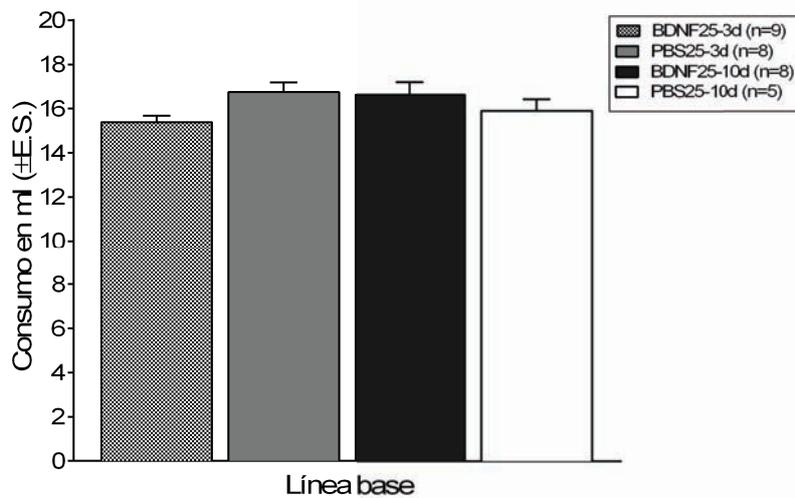


Figura 21. Promedio del consumo de agua durante la línea base entre los diferentes grupos.

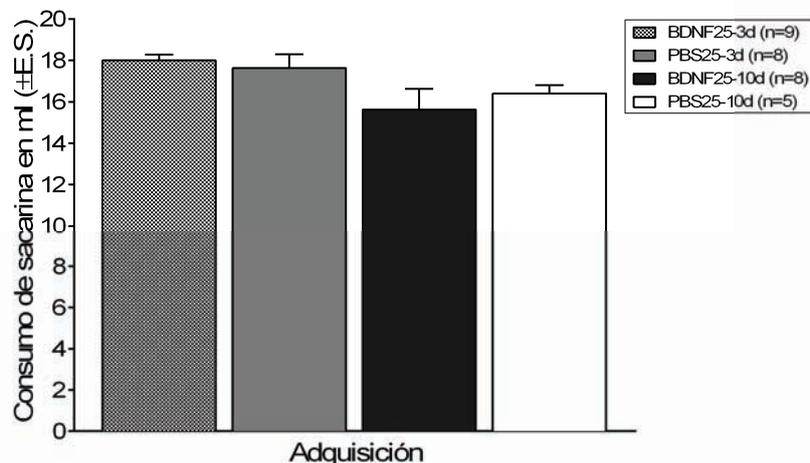


Figura 22. Promedio del consumo de sacarina durante la sesión adquisición entre los diferentes grupos.

El ANOVA de dos vías con medidas repetidas muestra diferencias significativas entre ambos grupos durante las sesiones de extinción ( $F_{(3,26)}= 40.28$ ,  $p<0.001$ ). El análisis post-hoc de Fisher muestra que los grupo BDNF25-3d y BDNF25-10d presentan diferencias significativas desde la primera hasta la sexta sesión de extinción ( $p<0.001$ ) con respecto a los grupos PBS25-3d y PBS25-10d (Fig. 23). Nuestros resultados son consistentes con estudios previos (Berman et al., 2003; Casa & Lubow, 2000) al mostrar que la aversión al sabor no muestra disminución aún diez días después de la adquisición. Este conjunto de resultados sugieren que la administración intracortical de BDNF promueve la extinción, aún cuando el lapso temporal entre la adquisición y la administración sea de 10 días.

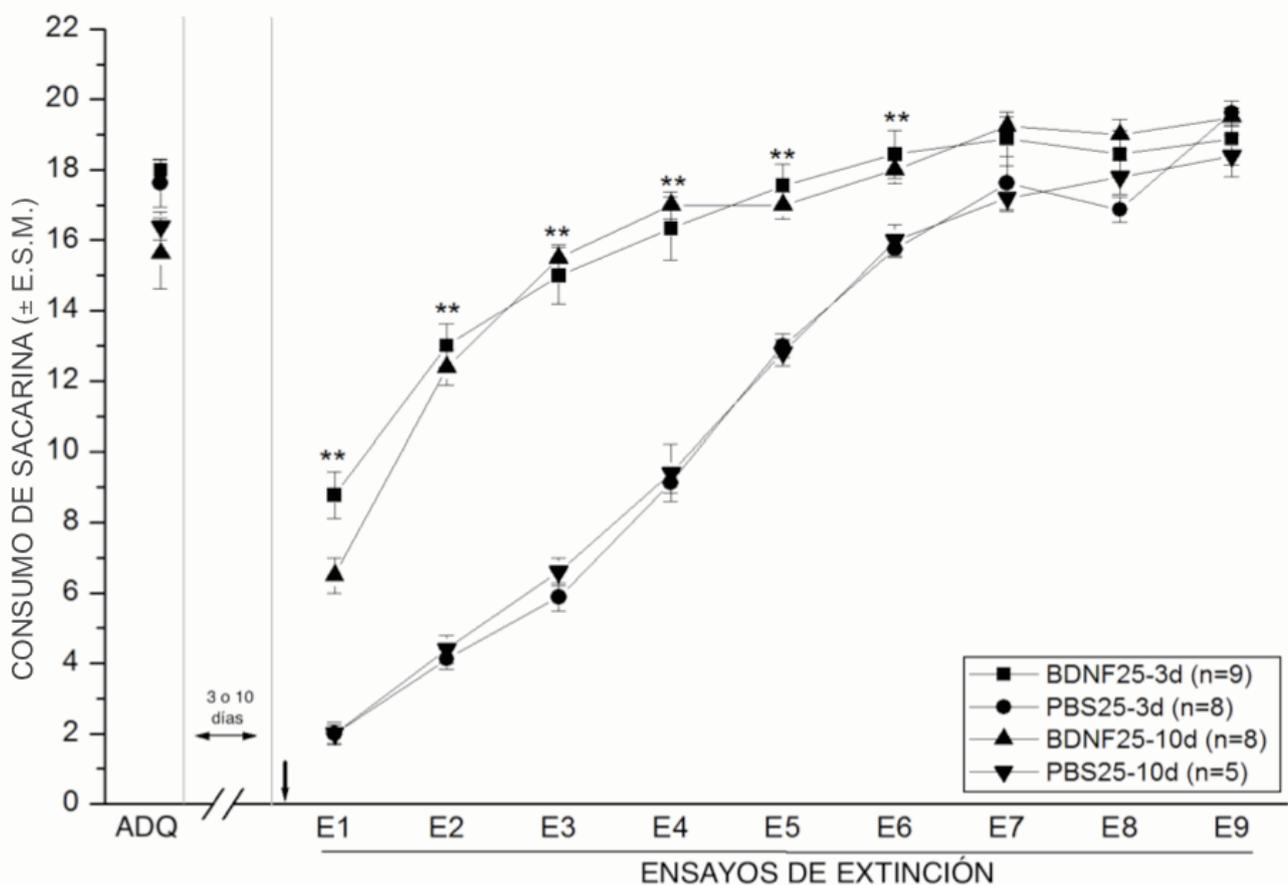


Figura 23. La administración intracortical de BDNF efectuada un día previo al primer ensayo de extinción, o bien tres o diez días después de la sesión de adquisición, promueve la extinción del CAS. La gráfica muestra la sesión de adquisición (ADQ) y los nueve ensayos de extinción (E1 a E9) efectuados en los grupos BDNF25-3d, PBS25-3d, BDNF25-10d y PBS25-10d. \*\*( $p<0.01$ ) con respecto a los grupos infundidos con PBS. La flecha indica la administración intracortical de BDNF efectuada 25 horas antes de la primera sesión de extinción.

### FASE 3. La administración de BDNF en la CI no elimina la memoria original del CAS

No se presentaron diferencias significativas entre los grupos durante el consumo de agua (línea base) ni durante el consumo de sacarina durante la sesión de adquisición del CAS. Los promedios del consumo de agua fueron los siguientes ( $\bar{X} \pm E.S.$ ):  $15.5 \pm 0.46$  y  $15.08 \pm 0.39$  para los grupos BDNF25+REA y PBS25+REA respectivamente (Fig. 24). Mientras los promedios del consumo de sacarina durante la adquisición fueron los siguientes ( $\bar{X} \pm E.S.$ ):  $16.1 \pm 0.72$  y  $15.2 \pm 0.36$  para los grupos BDNF25+REA y PBS25+REA respectivamente, como se muestra en la figura 25.

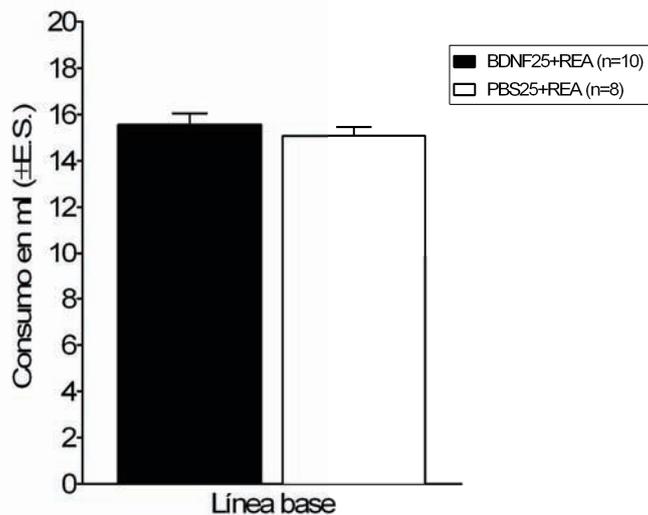


Figura 24. Promedio del consumo de agua durante la línea base entre los diferentes grupos.

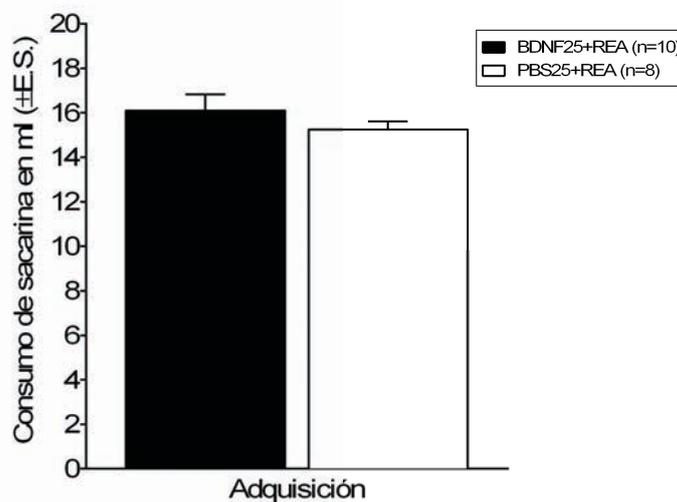


Figura 25. Promedio del consumo de sacarina durante la sesión adquisición entre los diferentes grupos.

Como muestra la figura 26, la administración intracortical de BDNF efectuada 25 horas antes de la primera sesión de extinción no afecta el trazo original de memoria del CAS. El ANOVA de dos vías con medidas repetidas muestra diferencias significativas entre ambos grupos ( $F_{(1,16)}= 37.9, p<0.001$ ). El análisis post-hoc de Fisher muestra que el grupo BDNF25+REA presenta diferencias significativas desde la primera hasta la quinta sesión de extinción ( $p<0.001$ ) con respecto al grupo PBS25+REA. Por otra parte, no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos durante la sesión de readquisición ni en los cuatro ensayos de extinción subsecuentes, sugiriendo que el BDNF no degrada el trazo original de memoria del CAS.

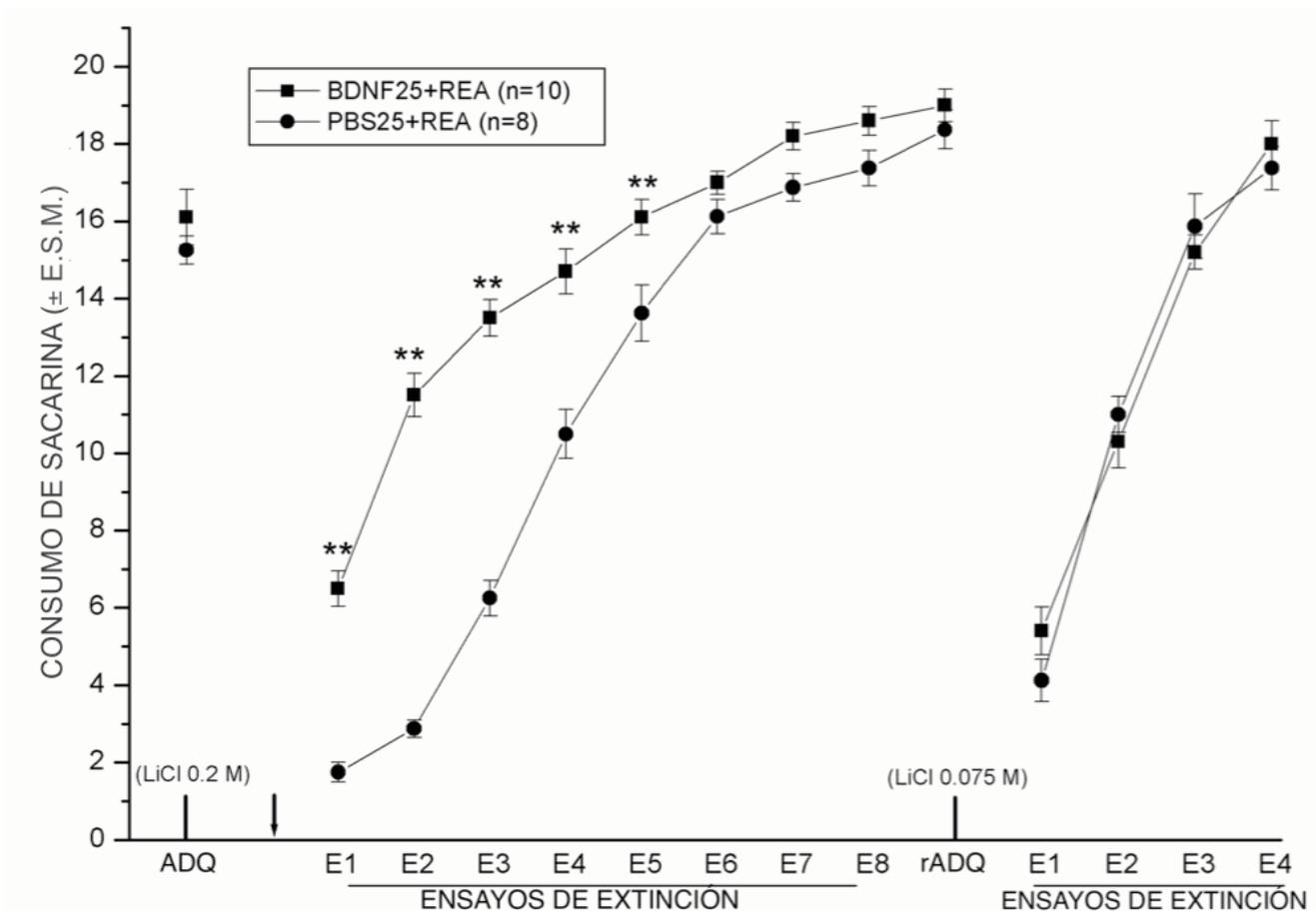


Figura 26. **La administración de BDNF en la CI no degrada el trazo original de memoria.** La gráfica muestra la sesión de adquisición (ADQ), ocho ensayos de extinción (E1 a E8) así como la sesión de readquisición (rADQ), seguida por cuatro ensayos de extinción (E1 a E4) para los grupos BDNF25+REA y PBS25+REA.  $** (p<0.01)$ . La flecha indica la administración intracortical de los fármacos.

Por otra parte, el análisis estadístico del experimento control efectuado con el propósito de demostrar que la concentración de cloruro de litio empleada en la sesión de readquisición (0.075M), induce una menor aversión al sabor, mostró diferencias significativas entre los grupos CAS-0.2M y CAS-0.075M durante la prueba de aversión ( $p < 0.001$ ). El presente resultado concuerda con reportes previos (Berman et al., 2003; Miranda et al., 2002; Wang et al., 2012), que muestran que es posible inducir una menor aversión al emplear una baja concentración de cloruro de litio como la empleada en la sesión de readquisición en el presente estudio (Fig. 24).

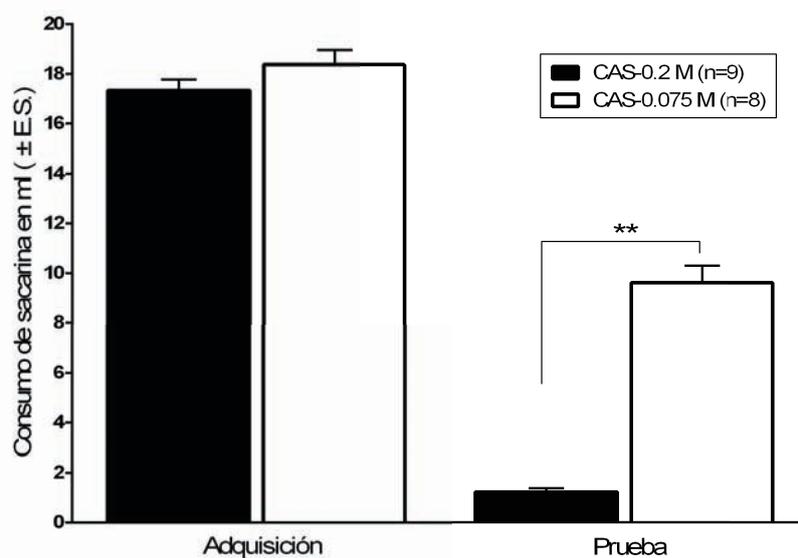


Figura 27. **Una baja concentración de cloruro de litio induce una menor aversión al sabor en el CAS.** Se muestra el promedio del consumo de sacarina en las sesiones de adquisición y prueba del CAS en los grupos CAS-0.2M y CAS-0.075M. \*( $p < 0.001$ ).

## DISCUSIÓN

El BDNF es una neurotrofina regulada por actividad neuronal, esencial para la expresión y persistencia de la plasticidad sináptica de largo plazo en el cerebro adulto (Bekinschtein et al., 2007; Pang et al., 2004). Aunado a lo anterior, se ha demostrado que la corteza insular participa tanto en la adquisición como en la consolidación del CAS, de manera dependiente de BDNF (Ma et al., 2011); sin embargo aún se desconocen los mecanismos que subyacen a la extinción de este condicionamiento. Al respecto, en el presente estudio mostramos que la administración aguda de BDNF en la CI es capaz de promover la extinción del CAS. Nuestros resultados muestran que el BDNF incrementa el consumo de sacarina

desde la primera sesión de extinción, lo que sugiere que esta neurotrofina inicia los mecanismos celulares relacionados con la extinción del citado condicionamiento en la corteza insular. Asimismo, la administración del inhibidor K252a en la CI bloquea el efecto producido por la neurotrofina, revelando que la modulación del BDNF depende de la activación de su receptor TrkB. Esta serie de resultados concuerdan con estudios previos en los que se ha demostrado que la sola administración de BDNF en la CIL es capaz de inducir la extinción del condicionamiento al miedo (Peters, Dieppa-Perea, Melendez, & Quirk, 2010; Rosas-Vidal et al., 2014). Adicionalmente, nuestros resultados muestran que la administración intracortical de BDNF reduce la aversión al sabor incluso cuando es administrado diez días después de la sesión de adquisición, cuando es posible considerar que el proceso de consolidación ha terminado. En este sentido, se ha demostrado que el BDNF endógeno en la CIL es necesario y suficiente para inducir la extinción de memorias asociadas al condicionamiento al miedo tanto recientes (1 día) como tardías (12 días), lo que sugiere que esta neurotrofina participa en la extinción, independientemente del intervalo temporal que se establezca entre la adquisición y la primera sesión de extinción (Rosas-Vidal et al., 2014). Aunado a lo anterior, se conoce que el BDNF es crucial para la persistencia de la memoria en diferentes ventanas temporales (Bekinschtein et al., 2007; Martínez-Moreno et al., 2011), particularmente el BDNF es requerido en la CI para la persistencia del CAS en intervalos de 5 y 7 horas tras la asociación del malestar gástrico (Martínez-Moreno et al., 2011); lo que sugiere que la permanencia de la memoria requiere de una reactivación constante de los mecanismos moleculares en la CI. Aunado con los presentes resultados, estos datos respaldan la idea de que la participación del BDNF en la CI es fundamental para la modulación del CAS.

Adicionalmente, los resultados derivados del presente estudio muestran que la administración bilateral de BDNF en la CI efectuada veinticinco horas antes del primer ensayo de extinción, incrementa el consumo de sacarina durante esta sesión, sugiriendo que la administración aguda de BDNF por sí misma puede activar la cascada de señalización intracelular relacionada con la extinción del CAS. Como se mencionó previamente, el BDNF reduce la aversión al sabor incluso cuando es administró 10 días después de la adquisición, lo que sugiere que el BDNF señala cascadas intracelulares relacionadas con la extinción a través de distintos mecanismos sinápticos de corto y largo plazo. Al respecto, se conoce que la

extinción del CAS involucra la formación de una nueva memoria y que su consolidación requiere de cambios plásticos (Bouton, 2004; Maroun et al., 2012; Mauk & Ohyama, 2004; Rescorla, 2001). Estudios previos han demostrado que la extinción potencia las conexiones entre el hipocampo y la corteza prefrontal por lo que al interferir con esta potenciación se interfiere con la extinción (Garcia, Spennato, Nilsson-Todd, Moreau, & Deschaux, 2008). Asimismo estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que la administración de BDNF en la CI, produce un incremento prolongado de la eficacia sináptica en el patrón de comunicación que va del núcleo basolateral amigdalino a la CI (Escobar et al., 2003). Por tanto, es probable que la extinción del CAS constituya una nueva memoria que requiere de BDNF para iniciar los mecanismos celulares relacionados con los cambios sinápticos inherentes a la misma (Minichiello, 2009; Musumeci & Minichiello, 2011).

Una vez que el BDNF se une a su receptor TrkB, se desencadena una serie de cascadas de señalización entre las que se incluyen la vía de las MAPK y la activación de PLC $\gamma$  (Minichiello et al., 2002). En combinación con las vías de señalización antes descritas, la interacción BDNF/TrkB es capaz de activar vías de señalización de PI3K y de las Rho GTPasas. En particular, esta última se ha destacado por su estrecha relación con las modificaciones estructurales de la sinapsis (Gómez-Palacio Schjetnan & Escobar-Rodríguez, 2007). A través de las vías antes mencionadas, el BDNF regula los cambios dependientes de actividad, que afectan las propiedades sinápticas relacionadas con el mantenimiento de la memoria de largo plazo de tareas como el condicionamiento al miedo, el laberinto acuático y el CAS (Bekinschtein et al., 2007; Martínez-Moreno et al., 2011; Sakata et al., 2013; Yamada & Nabeshima, 2003). Estudios previos de nuestro laboratorio muestran que la administración de BDNF en la CI un día previo al inicio del entrenamiento en el CAS, modifica la retención de la tarea a través de la activación de las vías de señalización de las MAPK y PI3K en la CI (Castillo et al., 2006; Castillo & Escobar, 2011). Estas vías de señalización, conducen a la activación de diferentes proteínas cinasas como PKC, PKA y CAMK's (cinasas dependientes de calcio-calmodulina). Estas proteínas translocan al núcleo, produciendo la fosforilación del factor de transcripción del elemento de unión responsivo a AMP cíclico (CREB) que induce la expresión de genes como Arc y Zif286 (Minichiello, 2009; Minichiello et al., 2002), dando como resultado la síntesis de nuevas proteínas

y promoviendo los cambios sinápticos relacionados con la memoria (Gómez-Palacio-Schjetnan & Escobar, 2013; Park & Poo, 2013).

Amplia evidencia experimental ha demostrado que la extinción no elimina el trazo original de la memoria, lo que sugiere que las áreas cerebrales relacionadas con la formación de memoria no retornan a su estado inicial tras la extinción (Bouton, 2004; Maroun et al., 2012; Mauk & Ohyama, 2004; Rescorla, 2001). En este sentido, la extinción del CAS consiste en re-catalogar un sabor como seguro una vez que fue asociado a un estímulo aversivo, lo que en algunas ocasiones involucra la modificación de su representación cortical (Accolla & Carleton, 2008; Garcia-Delatorre, Rodríguez-Ortiz, Balderas, & Bermúdez-Rattoni, 2010). Al respecto, los resultados del presente estudio muestran que la administración de BDNF en la CI no degrada el trazo original de memoria del CAS, puesto que no se observaron diferencias significativas entre el grupo que recibió BDNF y el grupo control tras la sesión de readquisición. Por otra parte, se conoce que la extinción puede ser modulada durante su consolidación (Myskiw et al., 2014). En este sentido nuestros resultados sugieren que el BDNF en la CI participa en la consolidación de la extinción del CAS. En concordancia con lo anterior se ha reportado que tanto el BDNF endógeno como su receptor TrkB presentan incrementos tanto en la CIL como en la ABL tras la extinción del CAS (Xin et al., 2014). Asimismo Sakata y colaboradores muestran en un estudio reciente que ratones mutantes que presentan una ablación selectiva de la expresión de BDNF en la corteza prefrontal exhiben deficiencias en la extinción del CAS (Sakata et al., 2013).

En suma, los presentes hallazgos demuestran la participación del BDNF en los mecanismos celulares que subyacen a la extinción de la memoria en regiones neocorticales; sugiriendo que esta neurotrofina constituye una pieza clave en la regulación y mediación de las modificaciones sinápticas de largo plazo.

## **CONCLUSIONES**

1. La administración aguda de BDNF en la CI es capaz de promover la extinción del CAS en ausencia del ensayo de extinción.
2. La administración aguda de BDNF no modifica el trazo inicial de memoria del CAS.
3. El BDNF inicia los mecanismos plásticos relacionados con la extinción en la CI.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, W. C. (2008). Metaplasticity: tuning synapses and networks for plasticity. *Nature Reviews. Neuroscience*, 9(5), 387.
- Accolla, R., & Carleton, A. (2008). Internal body state influences topographical plasticity of sensory representations in the rat gustatory cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(10), 4010–4015.
- Akirav, I. (2007). NMDA Partial agonist reverses blocking of extinction of aversive memory by GABA(A) agonist in the amygdala. *Neuropsychopharmacology*, 32(3), 542–550.
- Akirav, I., Khatsrinov, V., Vouimba, R.-M., Merhav, M., Ferreira, G., Rosenblum, K., & Maroun, M. (2006). Extinction of conditioned taste aversion depends on functional protein synthesis but not on NMDA receptor activation in the ventromedial prefrontal cortex. *Learning & Memory*, 13(3), 254–258.
- Akirav, I., Segev, A., Motanis, H., & Maroun, M. (2009). D-cycloserine into the BLA reverses the impairing effects of exposure to stress on the extinction of contextual fear, but not conditioned taste aversion. *Learning & Memory*, 16(11), 682–686.
- Almeida-Corrêa, S., Moulin, T. C., Carneiro, C. F. D., Gonçalves, M. M. C., Junqueira, L. S., & Amaral, O. B. (2015). Calcineurin inhibition blocks within-, but not between-session fear extinction in mice. *Learning & Memory*, 22(3), 159–169.
- Alonso, M., Vianna, M. R. M., Depino, A. M., Mello e Souza, T., 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(4), 551–560.
- Andero, R., & Ressler, K. J. (2012). Fear extinction and BDNF: translating animal models of PTSD to the clinic. *Genes, Brain, and Behavior*, 11(5), 503–512.
- Bahar, A., Dorfman, N., & Dudai, Y. (2004). Amygdalar circuits required for either consolidation or extinction of taste aversion memory are not required for reconsolidation. *European Journal of Neuroscience*, 19(4), 1115–1118.

- Baumgärtel, K., Genoux, D., Welzl, H., Tweedie-Cullen, R. Y., Koshibu, K., Livingstone-Zatchej, M., Mamie, C. & Mansuy, I. M. (2008). Control of the establishment of aversive memory by calcineurin and Zif268. *Nature Neuroscience*, 11(5), 572–578.
- Bear, M. F., Connors, B. W., & Paradiso, M. A. (2007). *Neuroscience: exploring the brain* (3a ed.). Baltimore EU: Willians & Wilkins.
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Igaz, L. M., Bevilaqua, L. R. M., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (2007). Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. *Neuron*, 53(2), 261–277.
- Berman, D. E., & Dudai, Y. (2001). Memory extinction, learning anew, and learning the new: dissociations in the molecular machinery of learning in cortex. *Science*, 291(5512), 2417–2419.
- Berman, D. E., Hazvi, S., Stehberg, J., Bahar, A., & Dudai, Y. (2003). Conflicting processes in the extinction of conditioned taste aversion: behavioral and molecular aspects of latency, apparent stagnation, and spontaneous recovery. *Learning & Memory*, 10(1), 16–25.
- Bermúdez-Rattoni, F. (2004). Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nature Reviews. Neuroscience*, 5(3), 209–217.
- Bermudez-Rattoni, F. (2014). The forgotten insular cortex: Its role on recognition memory formation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 109, 207–216.
- Bermudez-Rattoni, F., & McGaugh, J. L. (1991). Insular cortex and amygdala lesions differentially affect acquisition on inhibitory avoidance and conditioned taste aversion. *Brain Research*, 549(1), 165–170.
- Bermúdez-Rattoni, F., Núñez-Jaramillo, L., & Balderas, I. (2005). Neurobiology of taste-recognition memory formation. *Chemical Senses*, 30 Suppl 1, i156–157.
- Bernstein, B. W., & Bamburg, J. R. (2010). {ADF}/cofilin: a functional node in cell biology. *Trends in Cell Biology*, 20(4), 187–195.
- Bernstein, I. L., & Koh, M. T. (2007). Molecular signaling during taste aversion learning. *Chemical Senses*, 32(1), 99–103.
- Bi, A.-L., Wang, Y., Zhang, S., Li, B.-Q., Sun, Z.-P., Bi, H.-S., & Chen, Z.-Y. (2015). Myosin II regulates actin rearrangement-related structural synaptic plasticity during conditioned taste aversion memory extinction. *Brain Structure & Function*, 220(2), 813–825.

- Bouton, M. E. (2004). Context and behavioral processes in extinction. *Learning & Memory*, 11(5), 485–494.
- Bouton, M. E., Westbrook, R. F., Corcoran, K. a., & Maren, S. (2006). Contextual and temporal modulation of extinction: behavioral and biological mechanisms. *Biological Psychiatry*, 60(4), 352–360.
- Bowers, M. E., & Ressler, K. J. (2015). An overview of translationally informed treatments for posttraumatic stress disorder: animal models of pavlovian fear conditioning to human clinical trials. *Biological Psychiatry*, 78(5), E15–27.
- Bozzi, Y., Pizzorusso, T., Cremisi, F., Rossi, F. M., Barsacchi, G., & Maffei, L. (1995). Monocular deprivation decreases the expression of messenger RNA for brain-derived neurotrophic factor in the rat visual cortex. *Neuroscience*, 69(4), 1133–1144.
- Bradley, R. M., & Mistretta, C. M. (1971). Intravascular taste in rats as demonstrated by conditioned aversion to sodium saccharin. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 75(2), 186–189.
- Bramham, C. R., Southard, T., Sarvey, J. M., Herkenham, M., & Brady, L. S. (1996). Unilateral LTP triggers bilateral increases in hippocampal neurotrophin and trk receptor mRNA expression in behaving rats: evidence for interhemispheric communication. *The Journal of Comparative Neurology*, 368(3), 371–382.
- Bredy, T. W., Wu, H., Crego, C., Zellhoefer, J., Sun, Y. E., & Barad, M. (2007). Histone modifications around individual BDNF gene promoters in prefrontal cortex are associated with extinction of conditioned fear. *Learning & Memory*, 14(4), 268–276.
- Bures, J., & Buresova, O. (1989). Conditioned taste aversion to injected flavor: differential effect of anesthesia on the formation of the gustatory trace and on its association with poisoning in rats. *Neuroscience Letters*, 98(3), 305–309.
- Cammarota, M., Bevilaqua, L. R. M., Rossato, J. I., Ramirez, M., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2005). Relationship between short- and long-term memory and short- and long-term extinction. *Neurobiology of Learning and Memory*, 84(1), 25–32.
- Carmignoto, G., Pizzorusso, T., Tia, S., & Vicini, S. (1997). Brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor potentiate excitatory synaptic transmission in the rat visual cortex. *The Journal of Physiology*, 498 ( Pt 1), 153–164.

- Carvalho, A. L., Caldeira, M. V., Santos, S. D., & Duarte, C. B. (2008). Role of the brain-derived neurotrophic factor at glutamatergic synapses. *British Journal of Pharmacology*, 153 Suppl 1, S310–324.
- Casa, L. G. D. La, & Lubow, R. E. (2000). Super-latent inhibition with delayed conditioned taste aversion testing. *Animal Learning & Behavior*, 28(4), 389–399.
- Castillo, D. V., Figueroa-Guzmán, Y., & Escobar, M. L. (2006). Brain-derived neurotrophic factor enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Research*, 1067(1), 250–255.
- Castillo, D. V., & Escobar, M. L. (2011). A role for MAPK and PI-3K signaling pathways in brain-derived neurotrophic factor modification of conditioned taste aversion retention. *Behavioural Brain Research*, 217(1), 248–252.
- Chao, M. V. (2003). Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nature Reviews. Neuroscience*, 4(4), 299–309.
- Chen, X., Garelick, M. G., Wang, H., Lil, V., Athos, J., & Storm, D. R. (2005). PI3 kinase signaling is required for retrieval and extinction of contextual memory. *Nature Neuroscience*, 8(7), 925–931.
- 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(7), 802–807.
- Citri, A., & Malenka, R. C. (2008). Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, 33(1), 18–41.
- Delamater, A. R. (2004). Experimental extinction in Pavlovian conditioning: behavioural and neuroscience perspectives. *The Quarterly Journal of Experimental Psychology. B, Comparative and Physiological Psychology*, 57(2), 97–132.
- Domjan, M. (1985). Cue-consequence specificity and long-delay learning revisited. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 443, 54–66.
- Domjan, M. (2003). Bases del aprendizaje y conducta. México: Thomson.
- Do-Monte, F. H., Manzano-Nieves, G., Quiñones-Laracuente, K., Ramos-Medina, L., & Quirk, G. J. (2015). Revisiting the role of infralimbic cortex in fear extinction with optogenetics. *The Journal of Neuroscience*, 35(8), 3607–3615.

- Dudai, Y. (2002). Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. *Current Opinion in Neurobiology*, 12(2), 211–216.
- Dudai, Y., Karni, A., & Born, J. (2015). The consolidation and transformation of memory. *Neuron*, 88(1), 20–32.
- Escobar, M., Fernández, J., Guevara-Aguilar, R., & Bermúdez-Rattoni, F. (1989). Fetal brain grafts induce recovery of learning deficits and connectivity in rats with gustatory neocortex lesion. *Brain Research*, 478(2), 368–374.
- Escobar, M. (1994). El factor de crecimiento neuronal en el sistema nervioso central. *Ciencia*, 45, 21-34.
- 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. *Behavioural Brain Research*, 129(1-2), 101–106.
- Escobar, M. L., Alcocer, I., & Chao, V. (1998a). The NMDA receptor antagonist CPP impairs conditioned taste aversion and insular cortex long-term potentiation in vivo. *Brain Research*, 812(1-2), 246–251.
- Escobar, M. L., Chao, V., & Bermúdez-Rattoni, F. (1998b). In vivo long-term potentiation in the insular cortex: NMDA receptor dependence. *Brain Research*, 779(1-2), 314–319.
- Escobar, M. L., & Bermúdez-Rattoni, F. (2000). Long-term potentiation in the insular cortex enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Research*, 852(1), 208–212.
- Escobar, M. L., Figueroa-Guzmán, Y., & Gómez-Palacio-Schjetnan, A. (2003). In vivo insular cortex LTP induced by brain-derived neurotrophic factor. *Brain Research*, 991(1-2), 274–279.
- Fiorenza, N. G., Rosa, J., Izquierdo, I., & Myskiw, J. C. (2012). Modulation of the extinction of two different fear-motivated tasks in three distinct brain areas. *Behavioural Brain Research*, 232(1), 210–216.
- Fitzgerald, P. J., Seemann, J. R., & Maren, S. (2014). Can fear extinction be enhanced? A review of pharmacological and behavioral findings. *Brain Research Bulletin*, 105, 46–60.
- Furini, C., Myskiw, J., & Izquierdo, I. (2014). The learning of fear extinction. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 47, 670–683.

- Garcia-Delatorre, P., Rodríguez-Ortiz, C. J., Balderas, I., & Bermúdez-Rattoni, F. (2010). Differential participation of temporal structures in the consolidation and reconsolidation of taste aversion extinction. *The European Journal of Neuroscience*, *32*(6), 1018–1023.
- Garcia, J., Kimeldorf, D. J., & Koelling, R. A. (1955). Conditioned aversion to saccharin resulting from exposure to gamma radiation. *Science*, *122*(3160), 157–158.
- Garcia, J. & Koelling, R.A. (1966). Relation of cue to consequence in avoidance learning. *Psychonomic Science* *4*, 123-124.
- Garcia, J., Lasiter, P. S., Bermudez-Rattoni, F., & Deems, D. A. (1985). A general theory of aversion learning. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *443*, 8–21.
- Garcia, R., Spennato, G., Nilsson-Todd, L., Moreau, J.-L., & Deschaux, O. (2008). Hippocampal low-frequency stimulation and chronic mild stress similarly disrupt fear extinction memory in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, *89*(4), 560–566.
- Gerfen, C. R., & Clavier, R. M. (1979). Neural inputs to the prefrontal agranular insular cortex in the rat: horseradish peroxidase study. *Brain Research Bulletin*, *4*(3), 347–353.
- Gómez-Palacio-Schjetnan, A., & Escobar, M. L. (2008). In vivo BDNF modulation of adult functional and morphological synaptic plasticity at hippocampal mossy fibers. *Neuroscience Letters*, *445*(1), 62–67.
- Gómez-Palacio-Schjetnan, A., & Escobar, M. L. (2013). Neurotrophins and synaptic plasticity. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, *15*, 117–136.
- Gómez-Palacio Schjetnan, A., & Escobar-Rodríguez, M. L. (2007). [Memory coding and retention: brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in synaptic plasticity]. *Revista de Neurologia*, *45*(7), 409–417.
- Gómez-Pinilla, F., So, V., & Kesslak, J. P. (2001). Spatial learning induces neurotrophin receptor and synapsin I in the hippocampus. *Brain Research*, *904*(1), 13–19.
- Grossman, S. E., Fontanini, A., Wieskopf, J. S., & Katz, D. B. (2008). Learning-related plasticity of temporal coding in simultaneously recorded amygdala-cortical ensembles. *The Journal of Neuroscience*, *28*(11), 2864–2873.

- Hall, J., Thomas, K. L., & Everitt, B. J. (2000). Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning. *Nature Neuroscience*, 3(6), 533–535.
- Hartmann, M., Heumann, R., & Lessmann, V. (2001). Synaptic secretion of BDNF after high-frequency stimulation of glutamatergic synapses. *The EMBO Journal*, 20(21), 5887–5897.
- Hoover, W. B., & Vertes, R. P. (2007). Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain Structure & Function*, 212(2), 149–179.
- Huang, Y. Y., Nguyen, P. V., Abel, T., & Kandel, E. R. (1996). Long-lasting forms of synaptic potentiation in the mammalian hippocampus. *Learning & Memory*, 3(2-3), 74–85.
- Izquierdo, I., Bevilacqua, L. R. M., Rossato, J. I., Bonini, J. S., Medina, J. H., & Cammarota, M. (2006). Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends in Neurosciences*, 29(9), 496–505.
- Je, H.-S., Yang, F., Zhou, J., & Lu, B. (2006). Neurotrophin 3 induces structural and functional modification of synapses through distinct molecular mechanisms. *The Journal of Cell Biology*, 175(6), 1029–1042.
- Johnston, A. N., & Rose, S. P. (2001). Memory consolidation in day-old chicks requires BDNF but not NGF or NT-3; an antisense study. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 88(1-2), 26–36.
- Josselyn, S. A., Köhler, S., & Frankland, P. W. (2015). Finding the engram. *Nature Reviews. Neuroscience*, 16(9), 521–534.
- Kaczmarek, L. (1993). Molecular biology of vertebrate learning: is c-fos a new beginning? *Journal of Neuroscience Research*, 34(4), 377–381.
- Kandel, E. R. (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science*, 294(5544), 1030–1038.
- Kesslak, J. P., So, V., Choi, 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? *Behavioral Neuroscience*, 112(4), 1012–1019.
- Kim, K.-N., Kim, B.-T., Kim, Y.-S., Lee, J.-H., & Jahng, J. W. (2014). Increase of glucocorticoids is not required for the acquisition, but hinders the extinction, of

- lithium-induced conditioned taste aversion. *European Journal of Pharmacology*, 730, 14–19.
- Kinomura, S., Kawashima, R., Yamada, K., Ono, S., Itoh, M., Yoshioka, S., Yamaguchi, T., Matsui, H., Miyazawa, H., & Itoh, H. (1994). Functional anatomy of taste perception in the human brain studied with positron emission tomography. *Brain Research*, 659(1-2), 263–266.
- Kirtley, A., & Thomas, K. L. (2010). The exclusive induction of extinction is gated by BDNF. *Learning & Memory*, 17(12), 612–619.
- Klein, S. B. (1997). *Aprendizaje : principios y aplicaciones*. Madrid: McGraw-Hill.
- Kobilo, T., Hazvi, S., & Dudai, Y. (2007). Role of cortical cannabinoid CB1 receptor in conditioned taste aversion memory. *The European Journal of Neuroscience*, 25(11), 3417–3421.
- Koh, M. T., & Bernstein, I. L. (2003). Inhibition of protein kinase A activity during conditioned taste aversion retrieval: interference with extinction or reconsolidation of a memory? *Neuroreport*, 14(3), 405–407.
- Kolarow, R., Brigadski, T., & Lessmann, V. (2007). Postsynaptic secretion of BDNF and NT-3 from hippocampal neurons depends on calcium calmodulin kinase II signaling and proceeds via delayed fusion pore opening. *The Journal of Neuroscience*, 27(39), 10350–10364.
- Korte, M., Carroll, P., Wolf, E., Brem, G., Thoenen, H., & Bonhoeffer, T. (1995). Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(19), 8856–8860.
- Lasiter, P. S., Deems, D. A., Oetting, R. L., & Garcia, J. (1985). Taste discriminations in rats lacking anterior insular gustatory neocortex. *Physiology & Behavior*, 35(2), 277–285.
- LeDoux, J. E. (1993). Emotional memory: in search of systems and synapses. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 702, 149–157.
- Lessmann, V., & Brigadski, T. (2009). Mechanisms, locations, and kinetics of synaptic BDNF secretion: an update. *Neuroscience Research*, 65(1), 11–22.
- Lessmann, V., Gottmann, K., & Malsangio, M. (2003). Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Progress in Neurobiology*, 69(5), 341–374.

- Levine, E. S., Dreyfus, C. F., Black, I. B., & Plummer, M. R. (1995). Brain-derived neurotrophic factor rapidly enhances synaptic transmission in hippocampal neurons via postsynaptic tyrosine kinase receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(17), 8074–8077.
- Lin, C. H., Yeh, S. H., Lin, C. H., Lu, K. T., Leu, T. H., Chang, W. C., & Gean, P. W. (2001). A role for the PI-3 kinase signaling pathway in fear conditioning and synaptic plasticity in the amygdala. *Neuron*, *31*(5), 841–851.
- 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. *The Journal of Neuroscience*, *24*(36), 7958–7963.
- Lu, B., Pang, P. T., & Woo, N. H. (2005). The yin and yang of neurotrophin action. *Nature Reviews. Neuroscience*, *6*(8), 603–614.
- Lu, K. T., Walker, D. L., & Davis, M. (2001). Mitogen-activated protein kinase cascade in the basolateral nucleus of amygdala is involved in extinction of fear-potentiated startle. *The Journal of Neuroscience*, *21*(16), RC162.
- Lu, Y., Christian, K., & Lu, B. (2008). BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory? *Neurobiology of Learning and Memory*, *89*(3), 312–323.
- Ma, L., Wang, D.-D., Zhang, T.-Y., Yu, H., Wang, Y., Huang, S.-H., Lee, F.S., & Chen, Z.-Y. (2011). Region-specific involvement of BDNF secretion and synthesis in conditioned taste aversion memory formation. *The Journal of neuroscience*, *31*(6), 2079–2090.
- Maren, S. (2014). Out with the old and in with the new: synaptic mechanisms of extinction in the amygdala. *Brain Research*, *1621*, 231-238.
- Maroun, M., Kavushansky, A., Holmes, A., Wellman, C., & Motanis, H. (2012). Enhanced extinction of aversive memories by high-frequency stimulation of the rat infralimbic cortex. *PloS One*, *7*(5), e35853.
- Martínez-Moreno, A., Rodríguez-Durán, L. F., & Escobar, M. L. (2011). Late protein synthesis-dependent phases in CTA long-term memory: BDNF requirement. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *5*, 61.

- Mauk, M. D., & Ohyama, T. (2004). Extinction as new learning versus unlearning: considerations from a computer simulation of the cerebellum. *Learning & Memory*, *11*(5), 566–571.
- McAllister, A. K., Katz, L. C., & Lo, D. C. (1999). Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annual Review of Neuroscience*, *22*, 295–318.
- McGaugh, J. L., Castellano, C., & Brioni, J. (1990). Picrotoxin enhances latent extinction of conditioned fear. *Behavioral Neuroscience*, *104*(2), 264–267.
- Messaoudi, E., Ying, S.-W., Kanhema, T., Croll, S. D., & Bramham, C. R. (2002). Brain-derived neurotrophic factor triggers transcription-dependent, late phase long-term potentiation in vivo. *The Journal of Neuroscience*, *22*(17), 7453–7461.
- Mickley, G. A., Kenmuir, C. L., Yocom, A. M., Wellman, J. A., & Biada, J. M. (2005). A role for prefrontal cortex in the extinction of a conditioned taste aversion. *Brain Research*, *1051*(1-2), 176–182.
- Milad, M. R., & Quirk, G. J. (2012). Fear extinction as a model for translational neuroscience: ten years of progress. *Annual Review of Psychology*, *63*, 129–151.
- Milad, M. R., Vidal-Gonzalez, I., & Quirk, G. J. (2004). Electrical stimulation of medial prefrontal cortex reduces conditioned fear in a temporally specific manner. *Behavioral Neuroscience*, *118*(2), 389–394.
- Milner, B., Squire, L. R., & Kandel, E. R. (1998). Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron*, *20*(3), 445–468.
- Minichiello, L. (2009). TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nature Reviews. Neuroscience*, *10*(12), 850–860.
- Minichiello, L., Calella, A. M., Medina, D. L., Bonhoeffer, T., Klein, R., & Korte, M. (2002). Mechanism of TrkB-mediated hippocampal long-term potentiation. *Neuron*, *36*(1), 121–137.
- Miranda, M. I., Ferreira, G., Ramirez-Lugo, L., & Bermudez-Rattoni, F. (2002). Glutamatergic activity in the amygdala signals visceral input during taste memory formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(17), 11417–11422.
- Moguel-González, M., Gómez-Palacio-Schjetnan, A., & Escobar, M. L. (2008). BDNF reverses the CTA memory deficits produced by inhibition of protein synthesis. *Neurobiology of Learning and Memory*, *90*(3), 584–587

- Musumeci, G., & Minichiello, L. (2011). BDNF-TrkB signalling in fear learning: from genetics to neural networks. *Reviews in the Neurosciences*, 22(3), 303–315.
- Myers, K., & Davis, M. (2007). Mechanisms of fear extinction. *Molecular Pharmacology*, 12(2), 120–150.
- Myers, K. M., & Davis, M. (2002). Behavioral and neural analysis of extinction. *Neuron*, 36(4), 567–584.
- Myskiw, J. C., Izquierdo, I., & Furini, C. R. G. (2014). Modulation of the extinction of fear learning. *Brain Research Bulletin*, 105, 61–69.
- Nilsson, A. S., Fainzilber, M., Falck, P., & Ibáñez, C. F. (1998). Neurotrophin-7: a novel member of the neurotrophin family from the zebrafish. *FEBS Letters*, 424(3), 285–290.
- Norgren, R., & Leonard, C. M. (1971). Taste pathways in rat brainstem. *Science*, 173(4002), 1136–1139.
- Norgren, R., & Leonard, C. M. (1973). Ascending central gustatory pathways. *The Journal of Comparative Neurology*, 150(2), 217–237.
- Núñez-Jaramillo, L., Ramírez-Lugo, L., Herrera-Morales, W., & Miranda, M. I. (2010). Taste memory formation: latest advances and challenges. *Behavioural Brain Research*, 207(2), 232–248.
- Pang, P. T., Teng, H. K., Zaitsev, E., Woo, N. T., Sakata, K., Zhen, S., Teng, K.K., Yung, W-H., Hempstead, B., & Lu, B. (2004). Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science*, 306(5695), 487–491.
- Park, H., & Poo, M. (2013). Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nature Reviews. Neuroscience*, 14(1), 7–23.
- Patapoutian, A., & Reichardt, L. F. (2001). Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Current Opinion in Neurobiology*, 11(3), 272–280.
- Patz, S., & Wahle, P. (2004). Neurotrophins induce short-term and long-term changes of cortical neurotrophin expression. *The European Journal of Neuroscience*, 20(3), 701–708.
- Paxinos, G., & Watson, C. (2014). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. (7a ed.). San Diego EU: Elsevier Academic Press.
- Peters, J., Dieppa-Perea, L. M., Melendez, L. M., & Quirk, G. J. (2010). Induction of fear extinction with hippocampal-infralimbic BDNF. *Science*, 328(5983), 1288–1290.

- Pignataro, A., & Ammassari-teule, M. (2015). Post-extinction selective persistence of large dendritic spines in fear remodeled circuits may serve to reactivate fear, *Current Opinion in Neurobiology* 35, 1–5.
- Pritchard, T. C., Hamilton, R. B., Morse, J. R., & Norgren, R. (1986). Projections of thalamic gustatory and lingual areas in the monkey, *Macaca fascicularis*. *The Journal of Comparative Neurology*, 244(2), 213-28.
- Quirk, G. J., Garcia, R., & González-Lima, F. (2006). Prefrontal mechanisms in extinction of conditioned fear. *Biological Psychiatry*, 60(4), 337–343.
- Quirk, G. J., & Mueller, D. (2008). Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology*, 33(1), 56–72.
- Rescorla R.A., & Wagner A.R. (1972). A theory of Pavlovian conditioning: variations in the effectiveness of reinforcement and nonreinforcement. New York EU: Appleton-Century-Crofts.
- Rescorla, R. A. (2001). Retraining of extinguished Pavlovian stimuli. *Journal of Experimental Psychology. Animal Behavior Processes*, 27(2), 115–124.
- Rescorla, R. A. (2004). Spontaneous recovery. *Learning & Memory*, 11(5), 501–509.
- Reutter, K. & Witt, M. (1993). Morphology of vertebrate taste organs and their nerve supply. In Simon, S.A. & Roper, S.D. (Eds.). Mechanisms of taste transduction, Florida, EU: CRC Press, 29-82.
- Righi, M., Tongiorgi, E., & Cattaneo, A. (2000). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) induces dendritic targeting of BDNF and tyrosine kinase B mRNAs in hippocampal neurons through a phosphatidylinositol-3 kinase-dependent pathway. *The Journal of Neuroscience*, 20(9), 3165–3174.
- Robertson, E. M., Pascual-Leone, A., & Miall, R. C. (2004). Current concepts in procedural consolidation. *Nature Reviews. Neuroscience*, 5(7), 576–582.
- Rolls, E. T. (2015). Functions of the anterior insula in taste, autonomic, and related functions. *Brain and Cognition (In Press)*.
- Rosas-Vidal, L. E., Do-Monte, F. H., Sotres-Bayon, F., & Quirk, G. J. (2014). Hippocampal-prefrontal BDNF and memory for fear extinction. *Neuropsychopharmacology* 39(9), 2161-9.
- Rose, C. R., Blum, R., Pichler, B., Lepier, A., Kafitz, K. W., & Konnerth, A. (2003). Truncated TrkB-T1 mediates neurotrophin-evoked calcium signalling in glia cells. *Nature*, 426(6962), 74–78.

- Sakata, K., Martinowich, K., Woo, N. H., Schloesser, R. J., Jimenez, D. V., Ji, Y., Shen, L., & Lu, B. (2013). Role of activity-dependent BDNF expression in hippocampal–prefrontal cortical regulation of behavioral perseverance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(37), 15103–15108.
- Sandi, C. (2003). [Glucocorticoid involvement in memory consolidation]. *Revista de Neurologia*, *37*(9), 843–848.
- Santini, E., Sepulveda-Orengo, M., & Porter, J. T. (2012). Muscarinic receptors modulate the intrinsic excitability of infralimbic neurons and consolidation of fear extinction. *Neuropsychopharmacology*, *37*(9), 2047–2056.
- Schinder, A. F., & Poo, M. (2000). The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *Trends in Neurosciences*, *23* (12), 639–645.
- Shehadi, K., & Maroun, M. (2013). Different effects of low frequency stimulation to infralimbic prefrontal cortex on extinction of aversive memories. *Brain Research*, *1490*, 111–116.
- Sierra-Mercado, D., Padilla-Coreano, N., & Quirk, G. J. (2011). Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology*, *36*(2), 529–538.
- Slouzkey, I., Rosenblum, K., & Maroun, M. (2013). Memory of conditioned taste aversion is erased by inhibition of PI3K in the insular cortex. *Neuropsychopharmacology*, *38*(7), 1143–53.
- Tonegawa, S., Pignatelli, M., Roy, D. S., & Ryan, T. J. (2015). Memory engram storage and retrieval. *Current Opinion in Neurobiology*, *35*, 101–109.
- Uematsu, A., Kitamura, A., Iwatsuki, K., Uneyama, H., & Tsurugizawa, T. (2014). Correlation between activation of prelimbic cortex, the basolateral amygdala, and agranular insular cortex during taste memory formation. *Cerebral Cortex* *25*(9), 2719-2728.
- Vertes, R. P. (2004). Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse*, *51*(1), 32–58.
- Wang, W., Kang, S., Liu, W.-T., Li, M., Liu, Y., Yu, C., Chen, J., Chi, Z.-Q., He, L., & Liu, J.-G. (2012). Extinction of aversive memories associated with morphine withdrawal requires ERK-mediated epigenetic regulation of brain-derived neurotrophic factor transcription in the rat ventromedial prefrontal cortex. *The Journal of Neuroscience*, *32*(40), 13763–13775.

- Wang, Y., Dong, Q., Xu, X.-F., Feng, X., Xin, J., Wang, D.-D., Yu, H., Tian, T., & Chen, Z.-Y. (2013). Phosphorylation of cofilin regulates extinction of conditioned aversive memory via AMPAR trafficking. *The Journal of Neuroscience*, *33*(15), 6423–6433.
- Wang, Y., Zhang, T.-Y., Xin, J., Li, T., Yu, H., Li, N., & Chen, Z.-Y. (2012). Differential involvement of brain-derived neurotrophic factor in reconsolidation and consolidation of conditioned taste aversion memory. *PloS One*, *7*(11), e49942.
- Weiner, I., Tarrasch, R., Hasson, O., Forian, R., Smith, A. D., Rawlins, J. N. P., & Feldon, J. (1994). The effects of chronic administration of ceronapril on the partial reinforcement extinction effect and latent inhibition in rats. *Behavioural Pharmacology*, *5*(3), 306–314.
- Woo, N. H. & Lu, B. (2009). BDNF in synaptic plasticity and memory. In: Squire L. R., (Ed.). *Encyclopedia of Neuroscience*. Oxford: Academic Press, 135–143.
- Xin, J., Ma, L., Zhang, T.-Y., Yu, H., Wang, Y., Kong, L., & Chen, Z.-Y. (2014). Involvement of BDNF signaling transmission from basolateral amygdala to infralimbic prefrontal cortex in conditioned taste aversion extinction. *The Journal of Neuroscience*, *34*(21), 7302–7313.
- Yamada, K., & Nabeshima, T. (2003). Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. *Journal of Pharmacological Sciences*, *91*(4), 267–270.
- Yamamoto, T., Matsuo, R., Kiyomitsu, Y., & Kitamura, R. (1989). Taste responses of cortical neurons in freely ingesting rats. *Journal of Neurophysiology*, *61*(6), 1244–1258.
- Yamamoto, T., Shimura, T., Sako, N., Azuma, S., Bai, W. Z., & Wakisaka, S. (1992). C-fos expression in the rat brain after intraperitoneal injection of lithium chloride. *Neuroreport*, *3*(12), 1049–1052.
- Yan, Q., Rosenfeld, R. D., Matheson, C. R., Hawkins, N., Lopez, O. T., Bennett, L., & Welcher, A. A. (1997). Expression of brain-derived neurotrophic factor protein in the adult rat central nervous system. *Neuroscience*, *78*(2), 431–448.
- Yarmolinsky, D. A., Zuker, C. S., & Ryba, N. J. P. (2009). Common sense about taste: from mammals to insects. *Cell*, *139*(2), 234–244.
- Yasoshima, Y., Morimoto, T., & Yamamoto, T. (2000). Different disruptive effects on the acquisition and expression of conditioned taste aversion by blockades of

amygdalar ionotropic and metabotropic glutamatergic receptor subtypes in rats. *Brain Research*, 869(1-2), 15–24.

Zhang, Y., Sheng, H., Qi, J., Ma, B., Sun, J., Li, S., & Ni, X. (2012). Glucocorticoid acts on a putative G protein-coupled receptor to rapidly regulate the activity of NMDA receptors in hippocampal neurons. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 302(7), E747–758.

## ANEXO

Artículo que conjunta los principales hallazgos del proyecto de investigación que se presenta en esta tesis. Específicamente muestra que la administración de BDNF en la CI promueve la extinción del CAS. El artículo fue aceptado en octubre del 2014 y publicado en diciembre del mismo año.

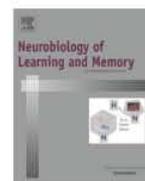
### Referencia:

Rodríguez-Serrano, L.M., Ramírez-León, B., Rodríguez-Durán, L.F., Escobar, M.L. (2014). Acute infusion of brain-derived neurotrophic factor in the insular cortex promotes conditioned taste aversion extinction, *Neurobiology of Learning and Memory* 116:139–144.



Contents lists available at ScienceDirect

# Neurobiology of Learning and Memory

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ynlme](http://www.elsevier.com/locate/ynlme)

## Rapid Communication

# Acute infusion of brain-derived neurotrophic factor in the insular cortex promotes conditioned taste aversion extinction



Luis M. Rodríguez-Serrano, Betsabee Ramírez-León, Luis F. Rodríguez-Durán, Martha L. Escobar\*

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

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 23 May 2014

Revised 29 September 2014

Accepted 13 October 2014

Available online 25 October 2014

#### Keywords:

Insular cortex

BDNF

Neocortical plasticity

Extinction

CTA

### ABSTRACT

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) has emerged as one of the most potent molecular mediators not only for synaptic plasticity, but also for the behavioral organism–environment interactions. Our previous studies in the insular cortex (IC), a neocortical region that has been related with acquisition and retention of conditioned taste aversion (CTA), have demonstrated that intracortical microinfusion of BDNF induces a lasting potentiation of synaptic efficacy in the basolateral amygdaloid nucleus (Bla)-IC projection and enhances the retention of CTA memory of adult rats in vivo. The aim of the present study was to analyze whether acute BDNF-infusion in the IC modifies the extinction of CTA. Accordingly, animals were trained in the CTA task and received bilateral IC microinfusions of BDNF before extinction training. Our results showed that taste aversion was significantly reduced in BDNF rats from the first extinction trial. Additionally, we found that the effect of BDNF on taste aversion did not require extinction training. Finally we showed that the BDNF effect does not degrade the original taste aversion memory trace. These results emphasize that BDNF activity underlies memory extinction in neocortical areas and support the idea that BDNF is a key regulator and mediator of long-term synaptic modifications.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) has been proposed as a key regulator and mediator of long-term synaptic modifications related to learning and memory (Lu, 2003; Park & Poo, 2013). There is growing interest on the role of BDNF in memory extinction (Andero & Ressler, 2012; Cowansage, LeDoux, & Monfils, 2010; Peters, Dieppa-Perea, Melendez, & Quirk, 2010; Rosas-Vidal, Domonte, Sotres-Bayon, & Quirk, 2014; Xin et al., 2014). In this regard, it has been shown that extinction of conditioned fear (Bredy et al., 2007) as well as conditioned place aversion (Wang et al., 2012) increases protein expression and gene transcription of BDNF in prefrontal cortex. In addition, Yu et al. (2009) showed that the variant BDNF-Val66Met polymorphism leads to a specific impairment in extinction of conditioned taste aversion (CTA), a very robust and widely used model for the study of learning and memory processes in which an animal acquires aversion to a novel taste when it is followed by digestive malaise (Bermúdez-Rattoni, 2004; Bermúdez-Rattoni, 2014; Yu et al., 2009). In this line of ideas, it has been reported that BDNF release and synthesis temporally

regulate CTA acquisition and consolidation (Ma et al., 2011). Our previous studies in the insular cortex (IC), a region of the temporal cortex in the rat that has been implicated in the acquisition and storage of different aversive-motivated learning tasks like CTA (Bermúdez-Rattoni, 2004; Bermúdez-Rattoni, 2014), have demonstrated that intracortical microinfusion of BDNF induces a long-lasting potentiation of synaptic efficacy in the basolateral nucleus of the amygdala (Bla) to the IC projection of adult rats in vivo (Escobar, Figueroa-Guzmán, & Gómez-Palacio-Schjetnan, 2003). Moreover, intracortical microinfusion of BDNF prior to CTA training enhances the retention of this task (Castillo, Figueroa-Guzmán, & Escobar, 2006), in a mitogen-activated protein kinase (MAPK) and phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) dependent manner (Castillo & Escobar, 2011). In addition, acute intracortical delivery of BDNF reverses the deficit in CTA memory, caused by inhibition of IC protein synthesis due to anisomycin administration (Moguel-González, Gómez-Palacio-Schjetnan, & Escobar, 2008). Recent studies suggest that BDNF promotes extinction of fear memories (Andero & Ressler, 2012). In this sense, infusion of BDNF 60 min before extinction in infralimbic (IL), but not in prelimbic (Pr) medial prefrontal cortex (mPFC), induces extinction of fear conditioning (Peters et al., 2010; Rosas-Vidal et al., 2014). However, the participation of BDNF in extinction of CTA remains unclear. In the present work we analyzed if the acute intracortical

\* Corresponding author at: División de Investigación y Estudios de Posgrado, Facultad de Psicología, Universidad Nacional Autónoma de México, C.P. 04510 México D.F., Mexico. Fax: +(52) (55) 56222310.

E-mail address: [mescobar@unam.mx](mailto:mescobar@unam.mx) (M.L. Escobar).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2014.10.007>

1074-7427/© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

infusion of BDNF, in a concentration capable to induce a lasting potentiation of synaptic efficacy in the insular cortex, modifies the extinction of CTA.

## 2. Methods

### 2.1. Animals

A total of 95 male Wistar rats weighting 350–380 g were prepared for our experiments. 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. Methods were carried out using adequate measures to minimize pain or discomfort in accordance with the guidelines of the Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) and the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals with the approval of the local animal care committee.

### 2.2. Cannulae implantation

Animals were implanted bilaterally with 23-gauge stainless steel cannulae under anesthesia (Pentobarbital, 50 ml/kg i.p.) using a previously described procedure (Moguel-González et al., 2008). The tips of the guide cannulae were aimed at 2 mm above the IC (Castillo et al., 2006). Microinjections were delivered through 30-gauge dental needles as microinjectors that extended 2 mm below the previously implanted guide cannulae (reaching the IC area). Dental needle microinjectors were attached by polyethylene tubing to a 10- $\mu$ l Hamilton syringe driven by a microinfusion pump (Cole Parmer Co., Vernon Hills, IL, USA). After surgery animals were allowed to recover for 7 days. All groups were histologically analyzed in order to verify the injector tip location.

### 2.3. Conditioned taste aversion

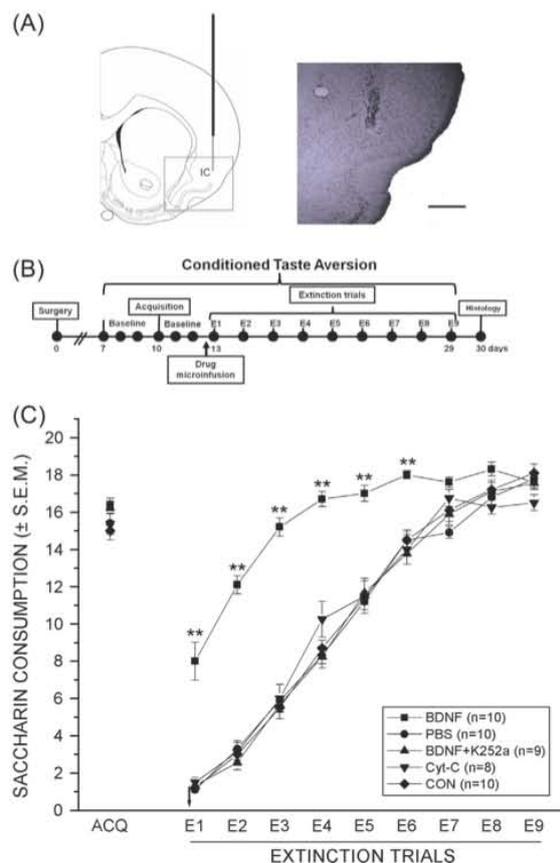
Seven days after surgery, animals were introduced in the CTA training, as previously described (Moguel-González et al., 2008; Rodríguez-Durán, Castillo, Moguel-González, & Escobar, 2011). Briefly, rats were deprived of water for 24 h and then habituated to drink water from a single graduated cylinder twice a day, during 10 min trials for 3 days. On the acquisition day, water was substituted for saccharin solution 0.1% (Sigma, St. Louis, MO, USA), and 10 min later, the animals received 7.5 ml/kg i.p. of a 0.2 M solution of LiCl, which induces digestive malaise. After three more days of baseline consumption, water was substituted newly by a 0.1% saccharin solution to test the aversion. The reduction of saccharin consumption was used as a measure of strength of the aversion. In order to determine the participation of BDNF in the CTA extinction, a total of nine extinction trials were given to all groups.

### 2.4. Experimental design

To evaluate the effects of IC microinfusion of BDNF on the extinction of CTA, animals were distributed in the following treatment groups: BDNF group ( $n = 10$ ), which received an intracortical infusion of BDNF (2  $\mu$ g/2  $\mu$ l, Alomone Labs, Jerusalem; Martínez-Moreno, Rodríguez-Durán, & Escobar, 2011; Moguel-González et al., 2008; Escobar et al., 2003; Castillo et al., 2006); PBS group ( $n = 10$ ) which received an intracortical infusion of phosphate buffer solution (2  $\mu$ l) as vehicle; CYT-C group ( $n = 8$ ), which received the same treatment as PBS group with PBS containing recombinant cytochrome c from yeast, a protein with similar physical and chemical properties as BDNF (2  $\mu$ g/2  $\mu$ l, Sigma, St. Louis, MO; Castillo et al., 2006) and BDNF+K252a group ( $n = 9$ ), which received the same treatment as the BDNF group in combination with K252a,

an inhibitor of Trk receptors (2  $\mu$ g of BDNF/2  $\mu$ l of K252a, 20  $\mu$ M, Alomone Labs., Jerusalem; Castillo & Escobar, 2011; Castillo et al., 2006). For all groups, intracortical infusions were given to hand-restrained conscious animals one hour before the first extinction trial and three days after the acquisition session (Peters et al., 2010). An additional control group (CON,  $n = 10$ ) remained intact during the whole procedure.

In order to determine whether the BDNF-induced reduction in taste aversion was independent upon the extinction session, we repeated the previous experiment but omitted the extinction training from the BDNF-infusion day. Animals were distributed in the following treatment groups: BDNF25-3d group ( $n = 9$ ), which received an intracortical infusion of BDNF (2  $\mu$ g/2  $\mu$ l, Alomone Labs, Jerusalem) and PBS25-3d group ( $n = 8$ ), which received an intracortical infusion of phosphate buffer solution (2  $\mu$ l) as vehicle. For both groups, intracortical infusions were given to hand-restrained conscious animals twenty-five hours before the first extinction trial and three days after the acquisition session. Animals were offered to drink water instead of saccharin one hour after the infusions. In order to discard late effects on consolidation of the original memory trace, we delayed the beginning of extinction in two additional groups (BDNF25-10d;  $n = 8$  and PBS25-10d;  $n = 5$ ), which in similar conditions as BDNF25-3d and PBS25-3d received intracortical infusions of BDNF or PBS respectively, ten days after the acquisition session.



**Fig. 1.** Insular cortex microinfusion of BDNF promotes CTA extinction. (A) Schematic representation and coronal section showing guide cannulae and microinjector placement in the IC (insular cortex). (B) Diagram of the experimental procedure. (C) Point-plot of the acquisition session (ACQ) and nine extinction trials (E1–E9) given to PBS, BDNF, CyT-C, BDNF+K252a and CON groups. \*\* $p < 0.01$ . Arrow indicates the acute intracortical infusion of drugs. Scale bar: 1 mm.

Experimental extinction does not reflect loss of the original memory, but rather reflects new learning (Berman, Hazvi, Stehberg, Bahar, & Dudai, 2003; Myers & Davis, 2002). Thus, in order to analyze whether intracortical infusion of BDNF modifies the original CTA memory-trace, two additional groups were introduced to a CTA reacquisition session. The animals were divided in the following groups: BDNF25+REA ( $n = 10$ ), which in the similar conditions as BDNF25-3d group received an intracortical infusion of BDNF ( $2 \mu\text{g}/2 \mu\text{l}$ , Alomone Labs, Jerusalem) twenty-five hours before the extinction trial and PBS25+REA group ( $n = 8$ ), which received an intracortical infusion of phosphate buffer solution ( $2 \mu\text{l}$ ) as vehicle, twenty-five hours before the extinction trial. Ten minutes after saccharin consumption during the ninth extinction trial animals from both groups received a  $7.5 \text{ ml/kg}$  i.p. of a  $0.075 \text{ M}$  solution of LiCl (Berman et al., 2003; Miranda, Ferreira, Ramirez-Lugo, & Bermúdez-Rattoni, 2002). This weaker unconditioned stimulus enables us to explore the reacquisition of CTA. Four additional extinction trials were given in order to extinguish the reacquired behavior.

### 3. Results

#### 3.1. Histology

Histological examinations revealed that injectors were correctly placed in the IC for all groups (Fig. 1A). Four animals with unclear cannula placements were discarded.

#### 3.2. Conditioned taste aversion acquisition

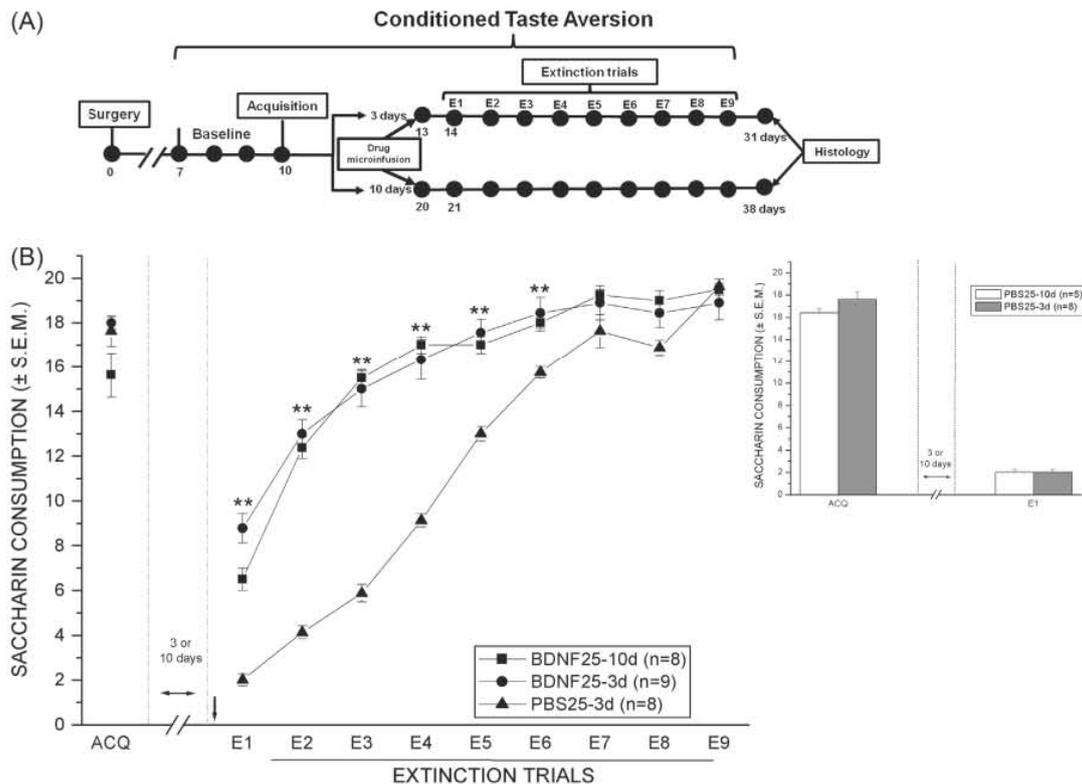
No significant differences were found among groups neither in the baseline water intake nor during the acquisition session.

#### 3.3. Infusion of BDNF in the IC promotes extinction of CTA

As shown in Fig. 1B, the intracortical microinfusion of BDNF in the IC one hour before the first CTA extinction trial reduces the taste aversion. Two-way ANOVA with repeated measures on the extinction sessions revealed significant differences among BDNF, PBS, BDNF+K252a, Cyt-C and CON groups ( $F_{(4,42)} = 44.88$ ,  $p < 0.001$ ). Post-hoc analysis with Fisher's test showed specific differences during the first, second, third, fourth, fifth and sixth extinction trials between BDNF and all the others groups ( $p < 0.001$ ). On the seventh, eighth and ninth extinction trials, no differences among groups were found, indicating that they all showed a maximum aversion and therefore a plateau effect. These results reveal that intracortical delivery of BDNF promotes CTA from the first extinction trial.

#### 3.4. BDNF-infusion in the IC reduced taste aversion without the first extinction session either 3 or 10 days after acquisition

As shown in Fig. 2, intracortical infusion of BDNF reduces taste aversion even when given at twenty-five hours before the first extinction trial and either 3 or 10 days after the acquisition session (Fig. 2B). Two-way ANOVA with repeated measures on the extinction sessions revealed significant differences among BDNF25-3d, PBS25-3d and BDNF25-10d groups ( $F_{(2,22)} = 39.67$ ,  $p < 0.001$ ). Post-hoc analysis with Fisher's test showed specific differences between PBS25-3d and both BDNF-infused groups during the first, second, third, fourth, fifth and sixth extinction trials ( $p < 0.001$ ). On the seventh, eighth and ninth extinction trials, no differences among groups were found. In addition, we show that in accordance with previous studies (Berman et al., 2003; De la Casa & Lubow,



**Fig. 2.** Intracortical infusion of BDNF one day prior to the first extinction trial and either 3 or 10 days after the acquisition session promotes CTA extinction. (A) Diagram of the experimental procedure. (B) Point-plot of the acquisition session (ACQ) and nine extinction trials (E1–E9) given to BDNF25-3d, PBS25-3d and BDNF25-10d groups. Inner graph shows the bar plot of saccharin consumption during the acquisition session (ACQ) and the first extinction trial (E1) for PBS25-10d and PBS25-3d groups. \*\* $p < 0.01$ . Arrow indicates the acute intracortical infusion of drugs 25 h before the first extinction trial.

2000), taste aversion remains unaltered even ten days after the acquisition session as can be observed in group PBS25-10d which did not showed significant differences with group PBS25-3d (inner graph Fig. 2B). Taken together these results suggest that intracortical infusion of BDNF in the IC promotes CTA extinction regardless the delay between acquisition and infusion.

3.5. BDNF does not degrade the original CTA memory-trace

As shown in Fig. 3B, intracortical infusion of BDNF twenty-five hours before the first extinction session do not affects the original CTA memory-trace. Two-way ANOVA with repeated measures on the extinction sessions revealed significant differences between BDNF25+REA and PBS25+REA groups ( $F_{(1,16)} = 37.9, p < 0.001$ ). Post-hoc analysis with Fisher's test showed specific differences during the first, second, third, fourth and fifth extinction trials ( $p < 0.001$ ). On the sixth, seventh, eighth and ninth extinction trials, no differences between groups were found. Also, not significant differences were found among groups neither in the reacquisition nor in the four subsequent extinction trials, suggesting that BDNF infusion left the original CTA-memory intact.

4. Discussion

BDNF has been considered as a protein synthesis product regulated by neuronal activity that is essential for the expression and persistence of long-term synaptic plasticity in the adult brain (Bekinschtein et al., 2007; Pang et al., 2004). It has been demonstrated that IC participates on both, the acquisition and consolidation

of CTA in a BDNF-dependent manner (Ma et al., 2011), but the mechanisms to underlie CTA-extinction remain unclear. In the present study we show that acute BDNF-infusion in the IC is able to promote extinction of CTA. Our results show that BDNF enhances the saccharin consumption from the first extinction trial, suggesting that BDNF-infusion initiates extinction-related mechanisms in this area. Microinfusion of K252a blocks the functional effects produced by BDNF, revealing that the BDNF modulation is dependent on its TrkB receptor activation. In agreement with our data, previous studies have demonstrated that a single BDNF-infusion is able to induce extinction of fear conditioning by itself in the infralimbic cortex (Peters et al., 2010; Rosas-Vidal et al., 2014). In addition, our present results show that intracortical infusion of BDNF reduces taste aversion even when given ten days after the acquisition session, when most of the consolidation processes have terminated. In this regard, it has been demonstrated that endogenous BDNF in infralimbic cortex is necessary and sufficient to induce extinction of recent (1 day) and older (14 days) fear memories, suggesting that this neurotrophin participates in fear conditioning extinction independently of the delay between the acquisition and the first extinction-trial (Rosas-Vidal et al., 2014). BDNF is crucial for the persistence of memories in different time windows (Bekinschtein et al., 2007; Martínez-Moreno et al., 2011). Particularly, BDNF in the IC is required for the persistence of CTA at 5 and 7 h after the taste-malaise association (Martínez-Moreno et al., 2011), suggesting that a new round of consolidation-like events take place in the IC for the maintenance of the CTA memory trace. Together with the present results, those data support the notion that BDNF in the IC is crucial for the ongoing modulation of CTA.

Additionally, our present results show that bilateral infusion of BDNF in the IC twenty-five hours before the first extinction trial

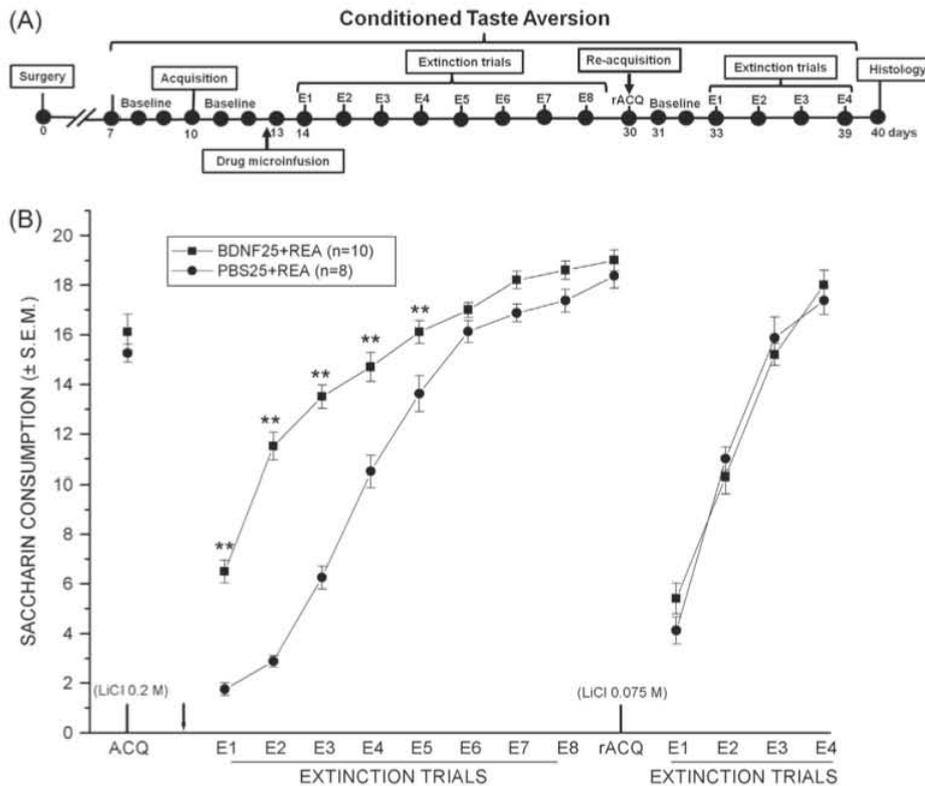


Fig. 3. BDNF microinfusion in the IC does not degrade the original CTA memory-trace. (A) Diagram of the experimental procedure. (B) The BDNF effect in CTA extinction does not degrade the original CTA memory-trace. Point-plot of the acquisition session (ACQ), eight extinction trials (E1–E8) and reacquisition session (rACQ) followed by four extra-extinction trials (E1–E4) given to BDNF25+REA and PBS25+REA groups. \*\* $p < 0.01$ . Arrow indicates the acute intracortical infusion of drugs.

enhances the saccharin consumption during this session, showing that the acute microinfusion of BDNF by itself could activate the downstream signaling related to CTA extinction. As mentioned before, the BDNF-dependent reduction in taste aversion was observed even when the neurotrophin was administered 10 days after the acquisition session. BDNF signaling may lead to extinction through several different mechanisms as short-term activation and long-term synaptic changes. Extinction of CTA forms a new memory and consolidation of extinction requires plasticity (Bouton, 2004; Maroun, Kavushansky, Holmes, Wellman, & Motanis, 2012; Mauk & Ohyama, 2004; Rescorla, 2001). Previous studies have demonstrated that extinction potentiates the hippocampal-prefrontal pathway, and disrupting this potentiation disrupts extinction recall (García, Spennato, Nilsson-Todd, Moreau, & Deschaux, 2008). In this regard, our previous studies showed that acute administration of BDNF in the IC in anesthetized adult rats induces a lasting potentiation of synaptic efficacy (Escobar et al., 2003). Thus, considering that extinction of CTA forms a new memory, BDNF dependent-communication could initiate a cascade of molecular mechanisms related with activity-dependent synaptic changes (Minichiello, 2009; Musumeci & Minichiello, 2011) that supports the extinction-related plasticity. This neurotrophin and its high affinity receptor TrkB trigger a molecular cascade of proteins, as the MAPK, the phospho-lipase C-gamma (PLC-gamma) and the PI-3K pathways (Minichiello et al., 2002). Through these pathways, BDNF regulates the activity-dependent changes in synaptic properties related with the maintenance of the long-term memory of learning tasks as fear conditioning, Morris water maze and CTA (Bekinschtein et al., 2007; Martínez-Moreno et al., 2011; Sakata et al., 2013; Yamada & Nabeshima, 2003). Our previous studies on the IC showed that microinfusion of BDNF previous to CTA training modifies the retention of this task, through the activation of MAPK and PI-3K at the IC (Castillo & Escobar, 2011; Castillo et al., 2006). The mentioned molecular cascades converge in the activation of transcription factors, such as cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein (CREB), which induce gene expression (e.g., Arc and Zif 286) and thereby memory-related synaptic changes (Minichiello, 2009; Minichiello et al., 2002).

Extensive evidence proposes that extinction does not reverse acquisition, suggesting that memory-related areas in the brain do not return to their naive state after the extinction of an acquired behavior (Bouton, 2004; Maroun et al., 2012; Mauk & Ohyama, 2004; Rescorla, 2001). Our present results show that BDNF infusion does not degrade the original CTA memory trace since no differences were found between BDNF-infused and control animals in the extent to which saccharin consumption could be reinstated after the reacquisition session. Extinction can be modulated by influencing its consolidation period (Myskiw, Izquierdo, & Furini, 2014) and we propose that BDNF in the IC participates in the consolidation of the CTA-extinction memory-trace. Accordingly, in a recent study Xin and collaborators demonstrated the participation of BDNF signaling transmission from basolateral amygdala to infralimbic prefrontal cortex in CTA extinction (Xin et al., 2014) and Sakata et al. (2013) showed that mutant mice with selective disruption of activity-dependent BDNF expression in prefrontal cortex impairs the extinction of CTA, stressing the importance of endogenous BDNF on this process (Sakata et al., 2013).

## 5. Conclusions

In summary, our data show that BDNF in the IC initiates CTA-extinction without altering the original memory-trace. These findings emphasize that BDNF activity underlies memory extinction in neocortical areas and support the idea that BDNF is a key regulator of long-term synaptic modifications.

## Acknowledgments

This research was supported by PAPIIT IN212013.

## References

- Andero, R., & Ressler, K. J. (2012). Fear extinction and BDNF: Translating animal models of PTSD to the clinic. *Genes, Brain, and Behavior*, 11(5), 503–512.
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Igaz, L. M., Bevilaqua, L. R., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (2007). Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF-dependent phase in the hippocampus. *Neuron*, 53(2), 261–277.
- Berman, D. E., Hazvi, S., Stehberg, J., Bahar, A., & Dudai, Y. (2003). Conflicting processes in the extinction of conditioned taste aversion: Behavioral and molecular aspects of latency, apparent stagnation, and spontaneous recovery. *Learning & Memory*, 10(1), 16–25.
- Bermúdez-Rattoni, F. (2004). Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(3), 209–217.
- Bermúdez-Rattoni, F. (2014). The forgotten insular cortex: Its role on recognition memory formation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 109C, 207–216.
- Bouton, M. E. (2004). Context and behavioral processes in extinction. *Learning & Memory*, 11(5), 485–494.
- Bredy, T. W., Wu, H., Crego, C., Zellhoefer, J., Sun, Y. E., & Barad, M. (2007). Histone modifications around individual BDNF gene promoters in prefrontal cortex are associated with extinction of conditioned fear. *Learning & Memory*, 14(4), 268–276.
- Castillo, D. V., & Escobar, M. L. (2011). A role for MAPK and PI-3K signaling pathways in brain-derived neurotrophic factor modification of conditioned taste aversion retention. *Behavioural Brain Research*, 217(1), 248–252.
- Castillo, D. V., Figueroa-Guzmán, Y., & Escobar, M. L. (2006). Brain-derived neurotrophic factor enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Research*, 1067(1), 250–255.
- Cowansage, K. K., LeDoux, J. E., & Monfils, M.-H. (2010). Brain-derived neurotrophic factor: A dynamic gatekeeper of neural plasticity. *Current Molecular Pharmacology*, 3(1), 12–29.
- De la Casa, L. G., & Lubow, R. E. (2000). Super-latent inhibition with delayed conditioned taste aversion. *Animal Learning & Behavior*, 28(4), 389–399.
- Escobar, M. L., Figueroa-Guzmán, Y., & Gómez-Palacio-Schjetnan, A. (2003). In vivo insular cortex LTP induced by brain-derived neurotrophic factor. *Brain Research*, 991(1–2), 274–279.
- García, R., Spennato, G., Nilsson-Todd, L., Moreau, J. L., & Deschaux, O. (2008). Hippocampal low-frequency stimulation and chronic mild stress similarly disrupt fear extinction memory in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 89(4), 560–566.
- Lu, B. (2003). BDNF and activity-dependent synaptic modulation. *Learning & Memory*, 10(2), 86–98.
- Ma, L., Wang, D.-D., Zhang, T.-Y., Yu, H., Wang, Y., Huang, S.-H., & Chen, Z.-Y. (2011). Region-specific involvement of BDNF secretion and synthesis in conditioned taste aversion memory formation. *The Journal of Neuroscience*, 31(6), 2079–2090.
- Maroun, M., Kavushansky, A., Holmes, A., Wellman, C., & Motanis, H. (2012). Enhanced extinction of aversive memories by high-frequency stimulation of the rat infralimbic cortex. *PLoS ONE*, 7(5), e35853.
- Martínez-Moreno, A., Rodríguez-Durán, L. F., & Escobar, M. L. (2011). Late protein synthesis-dependent phases in CTA long-term memory: BDNF requirement. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 5, 61.
- Mauk, M. D., & Ohyama, T. (2004). Extinction as new learning versus unlearning: Considerations from a computer simulation of the cerebellum. *Learning & Memory*, 11(5), 566–571.
- Minichiello, L. (2009). TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(12), 850–860.
- Minichiello, L., Calella, A. M., Medina, D. L., Bonhoeffer, T., Klein, R., & Korte, M. (2002). Mechanism of TrkB-mediated hippocampal long-term potentiation. *Neuron*, 36(1), 121–137.
- Miranda, M. I., Ferreira, G., Ramirez-Lugo, L., & Bermúdez-Rattoni, F. (2002). Glutamatergic activity in the amygdala signals visceral input during taste memory formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(17), 11417–11422.
- Moguel-González, M., Gómez-Palacio-Schjetnan, A., & Escobar, M. L. (2008). BDNF reverses the CTA memory deficits produced by inhibition of protein synthesis. *Neurobiology of Learning and Memory*, 90(3), 584–587.
- Musumeci, G., & Minichiello, L. (2011). BDNF-TrkB signalling in fear learning: From genetics to neural networks. *Reviews in the Neurosciences*, 22(3), 303–315.
- Myers, K. M., & Davis, M. (2002). Behavioral and neural analysis of extinction. *Neuron*, 36(4), 567–584.
- Myskiw, J. C., Izquierdo, I., & Furini, C. R. G. (2014). Modulation of the extinction of fear learning. *Brain Research Bulletin*, 105, 61–69.
- Pang, P. T., Teng, H. K., Zaitsev, E., Woo, N. T., Sakata, K., Zhen, S., & Lu, B. (2004). Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science*, 306(5695), 487–491.
- Park, H., & Poo, M. (2013). Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(1), 7–23.
- Peters, J., Dieppa-Perea, L. M., Melendez, L. M., & Quirk, G. J. (2010). Induction of fear extinction with hippocampal-infralimbic BDNF. *Science*, 328(5983), 1288–1290.

- Rescorla, R. A. (2001). Retraining of extinguished Pavlovian stimuli. *Journal of Experimental Psychology. Animal Behavior Processes*, 27(2), 115–124.
- Rodríguez-Durán, L. F., Castillo, D. V., Moguel-González, M., & Escobar, M. L. (2011). Conditioned taste aversion modifies persistently the subsequent induction of neocortical long-term potentiation in vivo. *Neurobiology of Learning and Memory*, 95(4), 519–526.
- Rosas-Vidal, L. E., Do-Monte, F. H., Sotres-Bayon, F., & Quirk, G. J. (2014). Hippocampal-prefrontal BDNF and memory for fear extinction. *Neuropsychopharmacology*, 39(9), 2161–2169.
- Sakata, K., Martinowich, K., Woo, N. H., Schloesser, R. J., Jimenez, D. V., Ji, Y., & Lu, B. (2013). Role of activity-dependent BDNF expression in hippocampal-prefrontal cortical regulation of behavioral perseverance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(37), 15103–15108.
- Wang, W.-S., Kang, S., Liu, W.-T., Li, M., Liu, Y., Yu, C., & Liu, J.-G. (2012). Extinction of aversive memories associated with morphine withdrawal requires ERK-mediated epigenetic regulation of brain-derived neurotrophic factor transcription in the rat ventromedial prefrontal cortex. *The Journal of Neuroscience*, 32(40), 13763–13775.
- Xin, J., Ma, L., Zhang, T.-Y., Yu, H., Wang, T., Kong, L., & Chen, Z.-Y. (2014). Involvement of BDNF signaling transmission from basolateral amygdala to infralimbic prefrontal cortex in conditioned taste aversion extinction. *The Journal of Neuroscience*, 34(21), 7302–7313.
- Yamada, K., & Nabeshima, T. (2003). Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. *Journal of Pharmacological Sciences*, 91(4), 267–270.
- Yu, H., Wang, Y., Pattwell, S., Jing, D., Liu, T., Zhang, Y., & Chen, Z.-Y. (2009). Variant BDNF Val66Met polymorphism affects extinction of conditioned aversive memory. *The Journal of Neuroscience*, 29(13), 4056–4064.