



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

Inducción de potenciación a largo plazo en la corteza insular (IC) por estimulación optogenética simultánea de la amígdala basolateral (BLA) y del área ventral tegmental (VTA).

TESIS

Que para obtener el título de

Licenciada en Psicología

P R E S E N T A

Diana Laura López Ibarra

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Luis Francisco Rodríguez Duran

REVISOR DE TESIS

Dr. César Casasola Castro

SINODALES

Dr. Hugo Sánchez Castillo

Dra. Zeidy Vanessa Muñoz Torres

Dr. Óscar Prospero García



® Facultad de Psicología

Ciudad Universitaria, CDMX

2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo fue realizado en el **Laboratorio de Neurobiología del Aprendizaje y Memoria** a cargo del Dr. Federico Bermúdez Rattoni en el departamento de Neurociencia Cognitiva de la División de Neurociencias del **Instituto de Fisiología Celular, UNAM**.

Este proyecto fue posible gracias a los financiamientos otorgados por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología del programa Fondo Institucional del CONAHCYT (FOINS 474), y del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) otorgado por la UNAM (DGAPA-PAPIIT-UNAM IN212919 y DGAPA-PAPIIT-UNAM IN213123).

Agradecimientos académicos

Al **Dr. Luis Francisco Rodríguez Durán** por su guía y apoyo en la realización de este proyecto, así como la paciencia durante todo el proceso.

Al **Dr. Federico Bermúdez Rattoni** por abrirme las puertas a su laboratorio, espacio que me encamino a encontrar mi pasión por la ciencia.

A mi revisor, **Dr. César Casasola Castro**, y mis sinodales, **Dr. Hugo Sánchez Castillo**, **Dra. Zeidy Vanessa Muñoz Torres** y **Dr. Óscar Prospero García** por sus aportaciones para enriquecer este proyecto.

Al bioterio del IFC y a la Unidad de Microscopia por su invaluable apoyo en el mantenimiento de los animales empleados para este proyecto y la captura de imágenes en el microscopio confocal, respectivamente.

Agradecimientos Personales

A mis papás, **Vero y Enrique**, gracias por todo el amor y respaldo en todo lo que he hecho en mi vida. Gracias por impulsarme a cumplir mis metas, por estar ahí cuando he tropezado y por ser mi pilar. Este logro también es de ustedes. Los amo.

A mi hermanita **Sam**, por inspirarme a crecer y a luchar por mis sueños. Por todas esas risas, distracción y complicidad en todo momento. No puedo tener mejor compañera de vida.

A mi tía **Lupe**, por siempre estar al pendiente de mí, por todos esos viajes y por ser un ejemplo a seguir. A mi prima **Alexa**, por crecer junto conmigo y por las palabras de aliento siempre. Gracias a las dos.

A mis abuelitos y especialmente a mi **abuelita Nona**, porque te tengo presente en cada paso que doy y porque fuiste parte fundamental de todo esto, por todo el cariño y amor brindado en todo el proceso.

Al gordito, **Picket**, que ha venido a iluminar mi vida con su ternura y cariño.

A **Suri Salinas y Diana Pérez**, por ser las mejores amigas que alguien podría pedir, por todos estos años de complicidad, por todas esas risas y experiencias que me han hecho ser quien soy. Infinitas gracias por seguir aquí.

A mis amigos de la fac, **Gabbs Terreros y Saúl Gámez**, por todas esas sesiones de estudio, por acompañarme en este camino de descubrimiento profesional, por todas las fiestas y por su compañía en la facultad. Los quiero.

A mi lab partner, **Gaby Herrera**, por acompañarme en todo este camino, por haber estado ahí en los días buenos y no tan buenos, por inspirarme a ser una mejor científica y por la complicidad en el laboratorio. La ciencia necesita a mujeres como tú, gracias.

A mis compañeros del BL-201 del IFC, por contribuir con su experiencia y enseñanzas a este trabajo y por sus comentarios que fortalecieron este proyecto.

A mis amigos del C-210 del IIB, especialmente a **Vale, Jess, Vero y Kari**, por esta red de apoyo que me ha dado soporte en esta última fase del proyecto.

A todos los **ratoncitos** de la ciencia, si estamos aquí es por ustedes. Les debemos mucho.

Contenido

Abreviaturas	7
Resumen	8
1. Antecedentes	9
1.1. Aprendizaje y memoria	9
1.2. Plasticidad sináptica.....	10
1.3. Potenciación a largo plazo.	11
1.4. Neuromodulación de la LTP.....	15
1.5. Adicción y el circuito VTA-IC-BLA	18
1.6. Optogenética.....	21
1.7. Optogenética y el estudio de la plasticidad sináptica <i>in vivo</i>	22
1.8. Conexiones funcionales en circuito VTA-IC-BLA	22
2. Planteamiento del problema	26
2.1. Objetivo general.....	26
2.2. Objetivos particulares.....	26
2.3. Hipótesis	27
3. Metodología.....	27
3.1. Animales	27
3.2. Genotipificación	28
3.3. Infusión estereotáxica de virus.....	29
3.4. Inducción de potenciación de largo plazo optogenética (oLTP)	30
3.5. Análisis inmunohistoquímico	32
3.6. Diseño experimental	33
3.6.1. Estimulación optogenética de las fibras provenientes de la BLA y del VTA en IC.	33
3.6.2. Estimulación optogenética de las fibras provenientes de la BLA en la IC. ..	33
3.6.3. Estimulación optogenética de las fibras provenientes del VTA en la IC.	34
3.7 Análisis estadístico.....	36
4. Resultados	37

4.1. Proyecciones en la corteza insular provenientes de la amígdala basolateral y del área ventral tegmental.	37
4.2. Efecto de la estimulación optogenética simultánea de las fibras provenientes del VTA y la BLA en la IC.	38
4.3. Efecto de la estimulación optogenética de las fibras provenientes del VTA en la IC.	43
4.4. Efecto de la estimulación optogenética de las fibras provenientes del BLA en la IC.	38
5. Discusión	47
5.1. La estimulación de las fibras provenientes del VTA, así como la fibras del BLA de forma individual no inducen LTP en la IC.....	48
5.2. Inducción de una LTP demorada en la IC por la estimulación optogenética simultánea del VTA y la BLA.....	52
5.3. La modulación catecolaminérgica de la STDP como un mecanismo de inducción de oLTP.	48
5.4. Posibles mecanismos moleculares involucrados en la inducción de oLTP en la IC por la estimulación simultánea de VTA-BLA.	53
5.5. Implicaciones del modelo en el estudio de las memorias adictivas.....	53
6.Conclusiones	55
7. Perspectivas	57
8. Referencias	58

Abreviaturas

AMPA	Ácido γ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol	LA	Amígdala lateral
AMPC	Monofosfato de adenosina cíclico	L-dopa	L-dihidroxifenilamina
rAVV	Vectores virales adenoasociados recombinantes	L-LTP	Potenciación a largo plazo tardía
BA	Amígdala basolateral	LTP	Potenciación a largo plazo
Ca²⁺	Calcio	MCP	Memoria a corto plazo
CamKII	Proteína quinasa II dependiente de calcio / calmodulina	Mg²⁺	Magnesio
CE	Núcleo de la amígdala central	MLP	Memoria a largo plazo
Cl⁻	Cloro	Na⁺	Sodio
CPP	Condicionamiento de preferencia de lugar	NMDA	N-metil-D-aspartato
CREB	Proteína de unión responsiva a AMPc	oLTP	Potenciación a largo plazo inducida optogenéticamente
ChR2	Proteína canal de rodopsina – 2	mPFC	Corteza prefrontal medial
ChETA	Canal de rodopsina-2 con una mutación E123T	NA	Noradrenalina
DA	Dopamina	oPSD	Despolarización postsináptica optogenética
DBH	Dopamina β – hidroxilasa	PPSEs	Potenciales postsinápticos excitatorios
DMS	Estriado dorso medial	PKA	Proteína cinasa A
E-LTP	Potenciación a largo plazo temprana	PKC	Proteína cinasa C
eYFP	Proteína fluorescente amarilla	PNMT	Enzima fentolamina N-metiltransferasa
GABA	Ácido aminobutírico	SNC	Sistema Nervioso Central
HF_s	Estimulación de alta frecuencia	STP	Plasticidad sináptica a corto plazo
HR	Proteína halorodopsina	TH	Enzima tirosina hidroxilasa
IC	Corteza insular	vHIPP	Hipocampo ventral
K⁺	Potasio	VTA	Área ventral tegmental

Resumen

La potenciación a largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés), es una expresión de plasticidad sináptica que se ha consolidado como un modelo para el estudio de mecanismos celulares y moleculares que subyacen al proceso de aprendizaje y memoria y conductas asociadas a reforzamiento, como en el caso de las adicciones. La adicción se asocia a la desorganización del denominado circuito de recompensa formado principalmente por las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral (VTA, por sus siglas en inglés) y sus conexiones con otras áreas cerebrales, entre las que se encuentran la corteza insular (IC, por sus siglas en inglés) y la amígdala basolateral (BLA, por sus siglas en inglés). Estudios previos de nuestro grupo sugieren que estas proyecciones podrían estar involucradas en el mantenimiento de la memoria contextual asociada a las adicciones. Se ha estudiado la plasticidad sináptica desde un enfoque de electrofisiología convencional, sin embargo, esta aproximación tiene varias limitaciones metodológicas. Por lo tanto, el objetivo general de este proyecto fue explorar la inducción de la LTP por medio de estimulación optogenética en la IC mediante la fotoestimulación simultánea de las fibras provenientes del VTA y la BLA. Los resultados mostraron que la estimulación optogenética simultánea de las fibras provenientes del VTA y la BLA induce una potenciación a largo plazo de inicio lento en la IC. La estimulación optogenética solo de las fibras dopaminérgicas en la IC provenientes del VTA no induce una LTP. De manera similar, la estimulación solo de las fibras glutamatérgicas en la IC provenientes de la BLA, no induce una LTP. En conclusión, los resultados sugieren que la modulación dopaminérgica de las fibras provenientes del VTA en conjunto con la activación de las fibras glutamatérgicas de la BLA son fundamentales para la inducción de la LTP en la IC como un posible mecanismo celular que subyace el mantenimiento de memorias adictivas.

1. Antecedentes

1.1. Aprendizaje y memoria

El aprendizaje se define como el proceso mediante el cual un organismo adquiere nueva información del contexto en el que está inmerso; por otro lado, la memoria se define comúnmente como el almacenamiento de la información aprendida (Bear, Connors y Paradiso, 2020). Ambos procesos están ampliamente relacionados y permiten la adaptación de los organismos a las demandas ambientales. Estos procesos permiten al organismo la selección y el mejoramiento de ciertos repertorios conductuales (Domjan, 2007).

La memoria comprende tres etapas para el procesamiento de información: la adquisición, consolidación y recuperación. Durante la adquisición, el sistema nervioso codifica los diversos estímulos sensoriales para su posterior almacenamiento. Durante la fase de consolidación, el trazo de memoria es gradualmente establecido mediante la integración de la nueva información en las redes preexistentes. Por último, en la etapa de recuperación, el organismo accede a la memoria almacenada para evocarla (Kandel, 2001).

La memoria también puede clasificarse en función del tipo de información que es almacenada. La memoria declarativa se refiere al almacenamiento y recuperación de información relacionada con hechos, acontecimientos o estímulos específicos (Squire, 1992, 2004). Por otra parte, la memoria no declarativa se refiere al almacenamiento y recuperación de información relacionada con habilidades motoras, hábitos, así como aprendizaje asociativo y no asociativo (Squire, 1992, 2004). La memoria además puede clasificarse en función de su temporalidad (Figura 1). La memoria a corto plazo (MCP) tiene una duración en el rango de segundos a horas, mientras que la memoria a largo plazo (MLP) puede durar desde días hasta años, incluso toda la vida (Bear et al., 2020). Es importante destacar que para el almacén de memorias a largo plazo se requieren procesos de reorganización persistentes dentro del sistema nervioso central (SNC) (McGaugh, 2000).

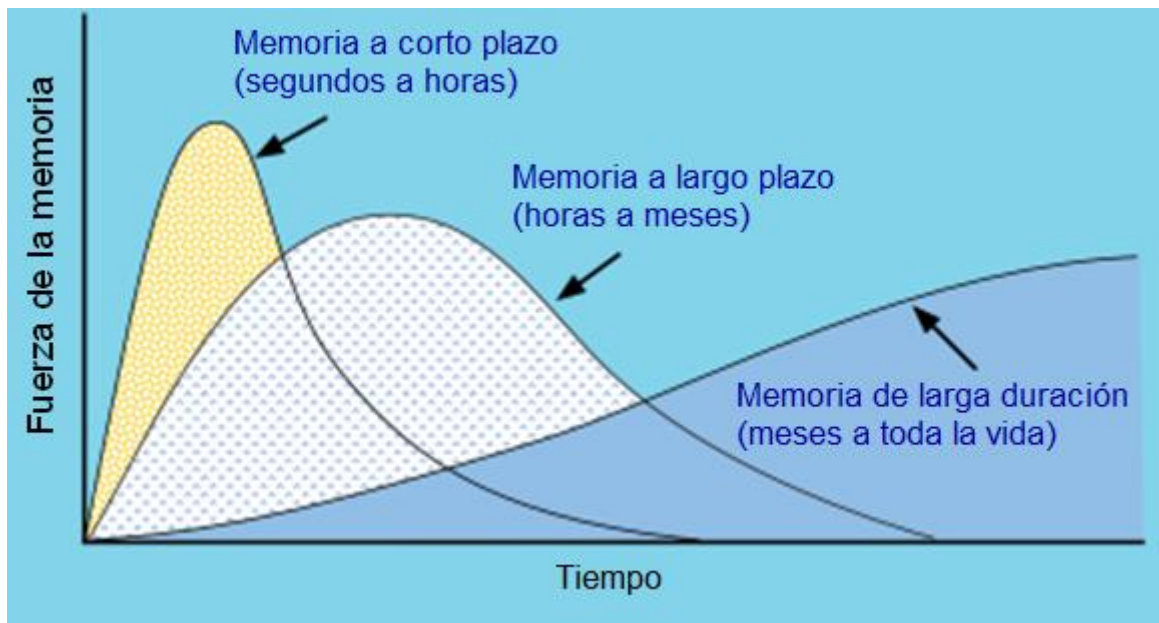


Figura 1. Esquema representativo de la clasificación temporal de la memoria. En el gráfico se observa la representación de MCP y MLP, donde se interpreta que la fuerza de la memoria varía en función del tiempo. Se representan las áreas bajo las curvas como procesos independientes y de forma paralela. La última etapa corresponde a la memoria de larga duración (Modificado de McGaugh, 2000).

A nivel neuronal, la formación de la memoria involucra cambios en la fuerza de conexiones sinápticas entre neuronas, modulando la eficiencia sináptica y construyendo nuevos circuitos neuronales (McGaugh, 2000). En este contexto, la adquisición y consolidación de la memoria requiere de modificaciones a nivel celular y molecular, lo que se conoce como plasticidad sináptica (Bear et al., 2020).

1.2. Plasticidad sináptica

La plasticidad sináptica se define como la capacidad del SN de ser objeto de modificaciones estructurales y funcionales dependientes de la actividad neuronal (Citri y Malenka, 2008). La plasticidad sináptica, además, tiene un papel clave en el desarrollo temprano de los circuitos neuronales (Khundrakpam et al., 2013) y la evidencia creciente indica que el deterioro de la plasticidad sináptica podría contribuir a deterioros cognitivos (Bliss, Collingridge y Morris, 2014). Por lo tanto, para entender el funcionamiento del SN es fundamental comprender los mecanismos que subyacen a la plasticidad sináptica en diferentes zonas del SN (Citri y Malenka, 2008).

Los cambios en la eficiencia sináptica pueden abarcar distintos dominios temporales que pueden ir desde el orden de milisegundos hasta meses e incluso años (Citri y Malenka, 2008). La plasticidad sináptica a corto plazo (STP, por sus siglas en inglés) puede durar desde milisegundos y hasta varios minutos. Este tipo de plasticidad tiene un papel importante en la adaptación de entradas sensoriales y cambios transitorios en la conducta del organismo (Zucker y Regehr, 2002). Por otro lado, la plasticidad a largo plazo puede durar meses e incluso años, y está relacionada con la formación de trazos de memoria de larga duración (Sweatt, 2016).

En este contexto, las expresiones de plasticidad a corto y a largo plazo están relacionadas con diferentes mecanismos celulares y moleculares que constituyen procesos de incorporación de nueva información a circuitos preexistentes como ocurre en los procesos de aprendizaje y memoria (Citri y Malenka, 2008; Sweatt, 2016). Para su estudio, se han desarrollado modelos experimentales que nos permiten abordar los mecanismos implicados en la plasticidad sináptica.

1.3. Potenciación a largo plazo.

Los cambios en la fuerza de las conexiones sinápticas, fue propuesto por Ramón y Cajal ya casi un siglo atrás (Ramón y Cajal, 1894). Cerca de 50 años después, en el tratado “La organización del comportamiento” (Hebb, 1949), Donald Hebb propone que la coincidencia entre la actividad pre y postsináptica induce cambio en la fuerza sináptica, a través de diferentes mecanismos celulares y moleculares (Nicoll, 2017). Hebb postula que, si una célula A excita de forma repetida y persistente a una célula B, la eficiencia de la conexión se incrementará (Hebb, 1949).

La propuesta de Hebb obtuvo su evidencia experimental con el descubrimiento de la potenciación a largo plazo por Bliss y Lømo en 1973, mostrando que la estimulación de alta frecuencia (100 Hz) produce cambios en la eficiencia sináptica (Bliss y Lømo, 1973). La LTP es definida como el incremento prolongado de la eficiencia sináptica como consecuencia de un patrón de estimulación inducido en fibras aferentes localizadas en una región del sistema nervioso (Bear et al., 2020) y ha sido considerada como un modelo celular que subyace al almacenamiento de información en el SN (Nicoll y Roche, 2008). Este fenómeno produce un incremento rápido y sostenido en la fuerza de las conexiones sinápticas que pueden persistir por varias horas, días e incluso meses (Abraham et al., 2002; Baltaci et al., 2019; Bliss &

Gardner-Medwin, 1973). La LTP es una expresión de plasticidad que puede producirse de forma natural por la experiencia sensorial (Cohen et al., 2011; Cooke y Bear, 2010), la maduración de las conexiones en las primeras etapas del desarrollo (Meister et al., 1991) o el aprendizaje de tareas conductuales (Rioult-Pedotti et al., 1998; Whitlock et al., 2006).

La LTP, exhibe 3 propiedades fundamentales: cooperatividad, asociatividad y especificidad (Figura 2) (Hao, Yang y Lei, 2018). La cooperatividad se refiere a que la inducción de LTP requiere de la activación coincidente de un número significativo de sinapsis, es decir, se presentaran alteraciones plásticas sólo cuando hay una activación simultánea de fibras presinápticas (Citri y Malenka, 2008; Hao et al., 2018). La asociatividad se refiere a que la LTP puede ser inducida en sinapsis que son activadas por estímulos débiles cuando su activación coincide de forma temporal con un estímulo capaz de inducir LTP en otro conjunto de sinapsis (Citri y Malenka, 2008; Hao et al., 2018). La especificidad se refiere a que solo las fibras que fueron estimuladas son modificadas (Citri y Malenka, 2008; Hao et al., 2018).

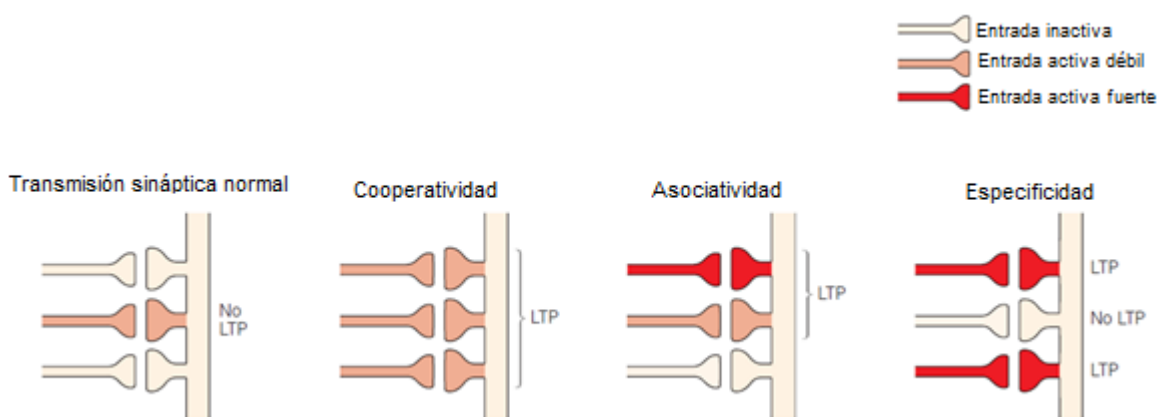


Figura 2. Propiedades generales de LTP: Cooperatividad, asociatividad y especificidad. Se observa de forma esquemática las propiedades características de LTP. Se puede observar en rojo la representación de entradas sinápticas fuertes, en color rosa las entradas débiles y en beige entradas inactivas. Los diferentes arreglos e interacción entre estas entradas sinápticas son fundamentales para la inducción de la LTP (Modificado de Kandel, 2013).

La LTP se puede dividir por su temporalidad en dos fases: Cuando la potenciación dura de 1 a 3 horas aproximadamente, se le denomina LTP temprana (E-LTP por sus siglas en inglés), y se ha reportado que para esta fase no se requiere

síntesis de proteínas (Baltaci et al., 2018). Por otro lado, si la actividad neuronal excede un umbral determinado, se inicia una serie de mecanismos moleculares que fortalecerán las sinapsis implicadas por una duración mayor a 3 horas. Este proceso es dependiente de la síntesis de proteínas y es denominada como LTP tardía (L-LTP) (Baltaci et al., 2018; Kandel, 2001). Se describirán brevemente parte de sus mecanismos implicados en la siguiente sección.

Mecanismos moleculares de la potenciación a largo plazo

Inicialmente el fenómeno de la LTP fue descrito en el hipocampo (Bliss y Gardner-Medwin, 1973) (Figura 3). Sin embargo, se ha reportado la expresión de LTP en diferentes áreas del SN, incluyendo la amígdala (Rogan, Staubli y LeDoux, 1997) y diversas zonas de la neocorteza cerebral, incluyendo la corteza insular (Feldman, 2009).

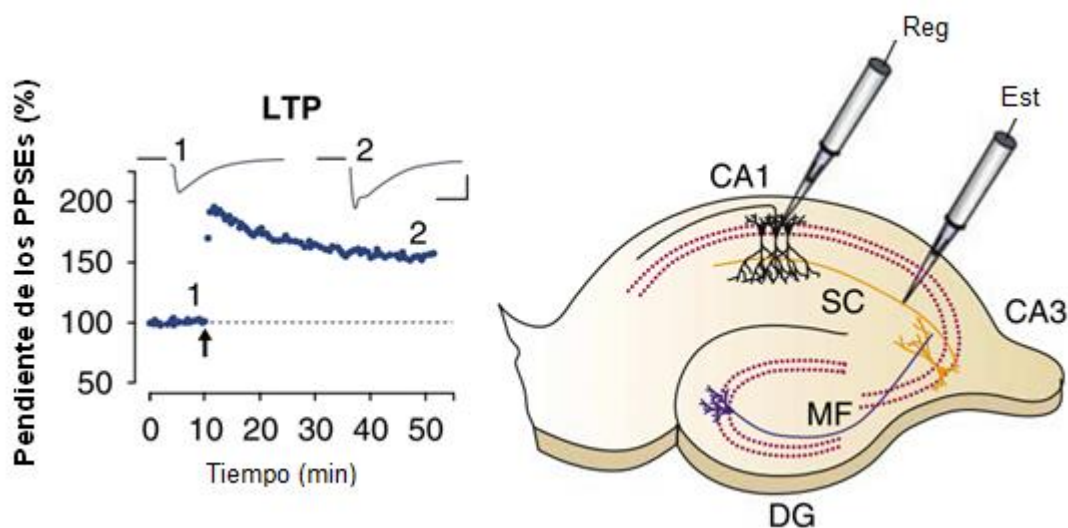


Figura 3. Ejemplo de LTP en las colaterales de Shaffer en el hipocampo. En la gráfica de la izquierda se representa el porcentaje de las pendientes de los PPSEs en función del tiempo. Al interior de la gráfica se muestran los trazos representativos tomados durante la línea basal (1) y después de aplicar trenes de estimulación de alta frecuencia (2). En la figura de la derecha, se observa la preparación empleada para el registro y estimulación en la vía descrita (SC: colaterales de Schaffer; MF: fibras musgosas; DG: giro dentado; CA1: región 1 del hipocampo; CA3: región 3 del hipocampo; Modificado de Citri y Malenka, 2008).

La inducción y mantenimiento de la LTP requiere de una cadena de eventos moleculares al interior de la célula y parte de dichos mecanismos serán descritos brevemente a continuación. En la fase temprana de la LTP, la coactivación de las

células pre- y postsinápticas promueven la liberación de glutamato en la neurona presináptica que provoca la apertura de los receptores AMPA (ácido γ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico), permitiendo la entrada de iones de Na^+ y despolarizando la membrana postsináptica (Figura 4a) (Lamprecht y LeDoux, 2004). Por otro lado, el receptor NMDA (N-metil-D-aspartato) es un canal ionotrópico que permite el influjo de Ca^{2+} , fundamental para la inducción de LTP (Volianskis et al., 2015). El receptor NMDA tiene un sitio de unión al glutamato. Sin embargo, en ausencia de actividad, el canal se encuentra bloqueado por iones Mg^{2+} (Mayer, Westbrook, y Guthrie, 1984). Debido a esto, es necesario el desbloqueo del canal por medio de dos eventos: la unión del glutamato y la despolarización de la membrana postsináptica (Figura 4b) (Citri y Malenka, 2008). El ingreso de Ca^{2+} a través de los receptores NMDA activa, entre otros mecanismos, a enzimas dependientes de calcio, como la proteína cinasa C (PKC) y la proteína quinasa II dependiente de calcio / calmodulina (CamKII) (Figura 4c), que a su vez regulan a otras proteínas (Figura 4d) (Lisman, Yasuda y Raghavachari, 2012).

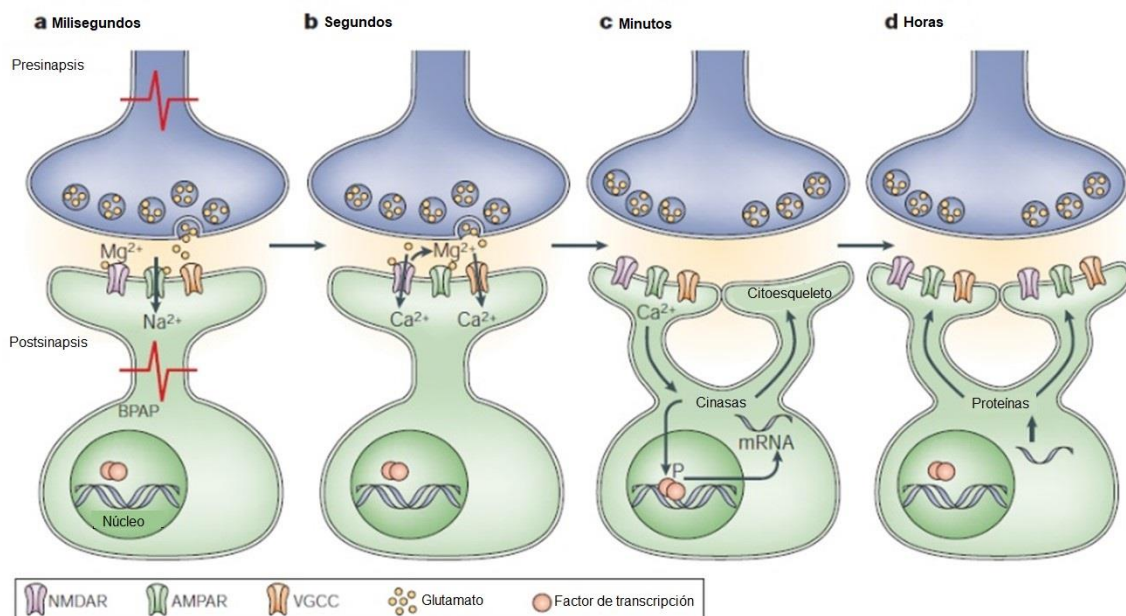


Figura 4. Mecanismos moleculares de la iniciación y mantenimiento de plasticidad sináptica en escala temporal. La activación de la pre- y postsinapsis desencadena varios eventos moleculares que van desde el orden de milisegundos hasta horas. Estos mecanismos contribuyen a la inducción y mantenimiento de la LTP (Modificado de Lamprecht y LeDoux, 2004).

En la fase tardía de la LTP, debido a la entrada masiva de Ca^{2+} y la actividad de neuromoduladores como las catecolaminas, se induce el reclutamiento de la enzima adenilato ciclasa que a su vez sintetiza monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) que activa a la proteína cinasa A (PKA). La activación de PKA, favorece la fosforilación de diversos sustratos que incluyen subunidades de receptores a glutamato como el receptor AMPA (Lombroso y Ogren, 2009). La activación de PKA también promueve la translocación de una de sus subunidades catalíticas al interior del núcleo. Al introducirse al núcleo, activa a factores de transcripción como la proteína de unión responsiva a AMPC (CREB) que interviene en la modulación de genes implicados en el mantenimiento de la plasticidad sináptica y el crecimiento de nuevas conexiones sinápticas (Meinkoth et al., 1993). Si bien las evidencias indican que la inducción de la LTP es de naturaleza glutamatérgica (Lamprecht y LeDoux, 2004; Volianskis et al., 2015), los sistemas de neuromodulación son fundamentales para el fortalecimiento de conexiones sinápticas (Bailey, Giustetto, Huang, Hawkins, y Kandel, 2000).

1.4. Neuromodulación de la LTP

Como se mencionó en líneas anteriores, la LTP es susceptible a ser modulada por la liberación de ciertos neurotransmisores (Johansen et al., 2014) como las catecolaminas, las cuales se conoce que están involucrados en los mecanismos de plasticidad sináptica (Liu et al., 2017; Seol et al., 2007; Xu y Yao, 2010).

Las catecolaminas son compuestos orgánicos derivados del grupo catecol que poseen una cadena lateral etil o etanolamina (Fuller, 1983). El aminoácido L-tirosina es el precursor de las tres catecolaminas que son la dopamina (DA), la noradrenalina (NA) y la adrenalina (A) (Bear et al., 2020). El primer paso en la síntesis de catecolaminas es catalizado por la tirosina hidroxilasa (TH) para sintetizar un compuesto denominado L-dopa (L-dihidroxifenilamina). La enzima L-Dopa es descarboxilada por la enzima dopa descarboxilasa para la síntesis de dopamina. La tercera enzima en esta secuencia es la dopamina β – hidroxilasa (DBH) que convierte la dopamina a norepinefrina. La DBH está localizada en el interior de vesículas sinápticas, es decir, en las terminales axónicas noradrenérgicas, por lo que DA es transportada del citosol a las vesicular sinápticas y ahí es transformado a NA (Bear et al., 2020). Finalmente, las neuronas adrenérgicas contienen la enzima fentolamina N-

metiltransferasa (PNMT), que sintetiza la NA en A (Figura 5) (Kandel, 2013). Las catecolaminas como la DA, la NA y la A interactúan en el espacio sináptico con los receptores presentes en la pre- y postsinapsis desencadenando una respuesta celular dependiente de AMP cíclico (Otani et al., 2015).

Los sistemas catecolaminérgicos se encuentran distribuidos a lo largo de diversas regiones cerebrales (Fuller, 1983). En particular, se presentan fibras dopaminérgicas en los sistemas nigroestriatal, mesolímbico, mesocortical y tuberoinfundibular (Lisman, 1999). Se ha reportado que la DA participa en la inducción de LTP y la formación de la memoria (Berke, 2018). En modelos *in vivo*, la administración de antagonistas de los receptores D1/D5, afectan el mantenimiento de la memoria de animales jóvenes y viejos, mientras que, la administración de agonistas de los receptores D1/D5 mejora la memoria en tareas dependientes de hipocampo (Hersi, Rowe, Gaudreau y Quirion, 1995). Esto es debido a que estos receptores están acoplados proteínas Gs que a su vez provocan la activación de la enzima adenilato ciclasa que sintetiza el AMPc a partir de adenosina de trifosfato (ATP) fomentando así la síntesis de proteínas relevante en la modulación de LTP (Greengard, 2001). Adicionalmente, otros estudios indican que la aplicación de antagonistas de DA en el hipocampo, bloquean la fase tardía de la LTP (Frey et al., 1993; Huang y Kandel, 1995), impidiendo la síntesis de proteínas necesarias para su persistencia (Frey et al., 1993). Estos hallazgos muestran que las proyecciones de neuronas catecolaminérgicas son importantes para la estabilización de la fase tardía de la LTP y son relevantes para la modulación de la memoria (Castellano, Cestari, Cabib y Puglisi-Allegra, 1991; Gold y van Buskirk, 1978).

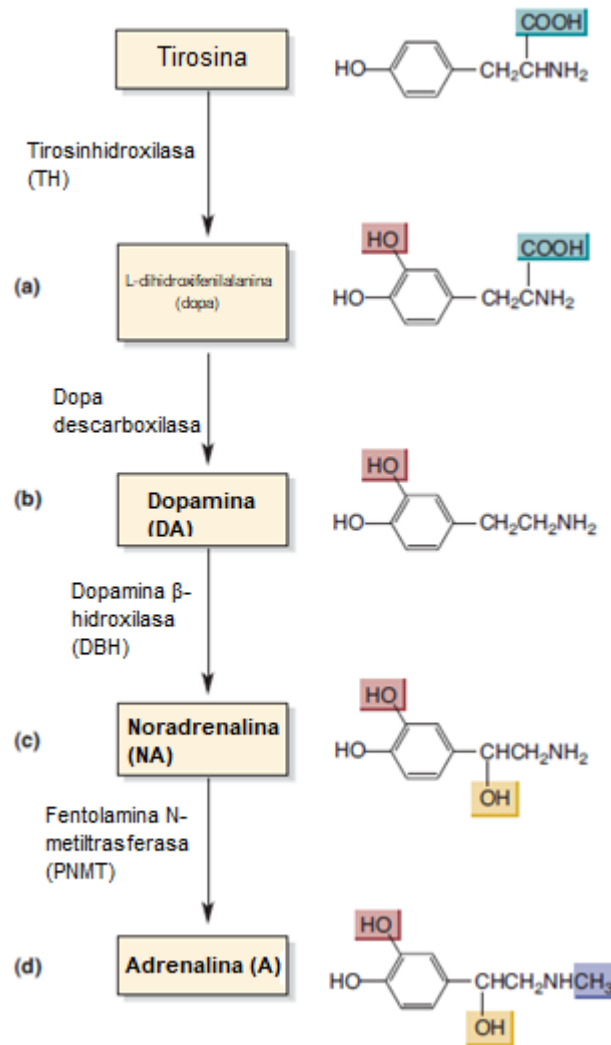


Figura 5. Síntesis de catecolaminas a partir de la tirosina. Se señalan las enzimas implicadas en las reacciones de la vía de síntesis de L-dopa. En negritas, están señaladas las catecolaminas sintetizadas. Además, se representa la estructura cíclica de las moléculas (Modificado de Bear, 2020).

En síntesis, la LTP es susceptible a ser modulada por neurotransmisores catecolaminérgicos como la DA (Martin et al., 2000). La LTP ayuda a explicar la formación, estabilización y mantenimiento de conexiones en circuitos involucrados con procesos de aprendizaje y memoria, así como conductas asociadas a reforzamiento y recompensa, como en el caso de las adicciones (Kauer y Malenka, 2007).

1.5. Adicción y el circuito VTA-IC-BLA

La adicción se define como un trastorno crónico y recurrente caracterizado por la búsqueda y el uso compulsivo de drogas a pesar de las consecuencias adversas (National Institute on Drug Abuse (NIDA, 2020). Las adicciones son un problema de salud pública de alta relevancia a nivel mundial, es por ello, que surge la necesidad de entender sus mecanismos neurobiológicos (Ali et al., 2011).

La evidencia creciente en el campo de la neurobiología de las adicciones reporta que esta enfermedad está asociadas a la desorganización del denominado circuito de recompensa (Russo y Nestler, 2013). El circuito de recompensa está formado principalmente por proyecciones dopaminérgicas que proyectan desde el área ventral tegmental (VTA), al núcleo accumbens (NAc) y a otras estructuras como la corteza prefrontal medial, la amígdala basolateral (BLA) o la corteza insular (IC) (Figura 6).

La IC es una región ubicada en la neocorteza en el lóbulo temporal, compuesta por 3 regiones: la zona granular dorsal, la zona disgranular medial y la zona agranular ventral (Bermudez-Rattoni, 2014). Durante mucho tiempo se ha estudiado que la IC está implicada en diferentes tipos de memoria como la memoria gustativa (Escobar y Bermúdez-Rattoni, 2000), la representación de la asignación del valor motivacional de una recompensa (Droutman, Read y Bechara, 2015) y el mantenimiento del aprendizaje de asociaciones apetitivas (Nasser, Lafferty, Lesser, Bacharach y Calu, 2017). Además, se han reportado evidencias que indican la participación de la IC en la adicción a sustancias (Contreras et al., 2012; Naqvi et al., 2007; Pushparaj y Le Foll, 2015). En un estudio clínico se observó la interrupción del hábito de fumar en fumadores crónicos después de presentar daño en la IC anterior como resultado de un accidente cerebrovascular (Naqvi, Rudrauf, Damasio, y Bechara, 2007). Adicionalmente, los participantes del estudio no mostraron recaídas. Estos resultados, fueron además corroborados en estudios con roedores administrando sustancias adictivas como la nicotina (Contreras et al., 2012) y el alcohol (Pushparaj y Le Foll, 2015).

Por otra parte, investigaciones previas de nuestro grupo de investigación sugieren que la participación de la IC en conductas asociadas a recompensas está

relacionada con sus conexiones con la BLA y el VTA (Gil-Lievana et al., 2020). Se ha reportado que la estimulación eléctrica de alta frecuencia (100 Hz) (HFS) en la BLA induce LTP en la IC (ver Figura 7), lo cual sugiere una conexión funcional entre las dos áreas y que esta conexión es susceptible a cambios plásticos (Escobar, 2000).

La BLA es vital para codificar la saliencia y valencia de estímulos (Uwano, Nishijo, Ono y Tamura, 1995). Asimismo, se ha propuesto como una estructura clave en la conducta de búsqueda de recompensas (Ambroggi, Ishikawa, Fields y Nicola, 2008). Esta zona está compuesta principalmente por células glutamatérgicas e interneuronas gabaérgicas (Janak y Tye, 2015). Se ha descrito que además recibe información del núcleo lateral de la amígdala y manda proyecciones al núcleo central (Janak y Tye, 2015) y también a zonas corticales, incluida la corteza insular (Miranda y McGaugh, 2004).

Como mencionamos, otra estructura que tiene importantes conexiones con la IC es el VTA, un grupo de neuronas adyacente a la sustancia negra que es considerado el origen del sistema modulador dopaminérgico (Lammel, Lim y Malenka, 2014). El VTA es una zona compuesta principalmente de neuronas dopaminérgicas (60% a 65%), neuronas gabaérgicas (30% a 35%) y una proporción pequeña de neuronas glutamatérgicas (2% a 3%) (Cooper, Robison, y Mazei-Robison, 2017). Además, se ha reportado que el VTA recibe proyecciones de neuronas noradrenérgicas provenientes de zonas periféricas que reciben información visceral relacionada con el mantenimiento de la adicción (Mejias-Aponte, 2016).

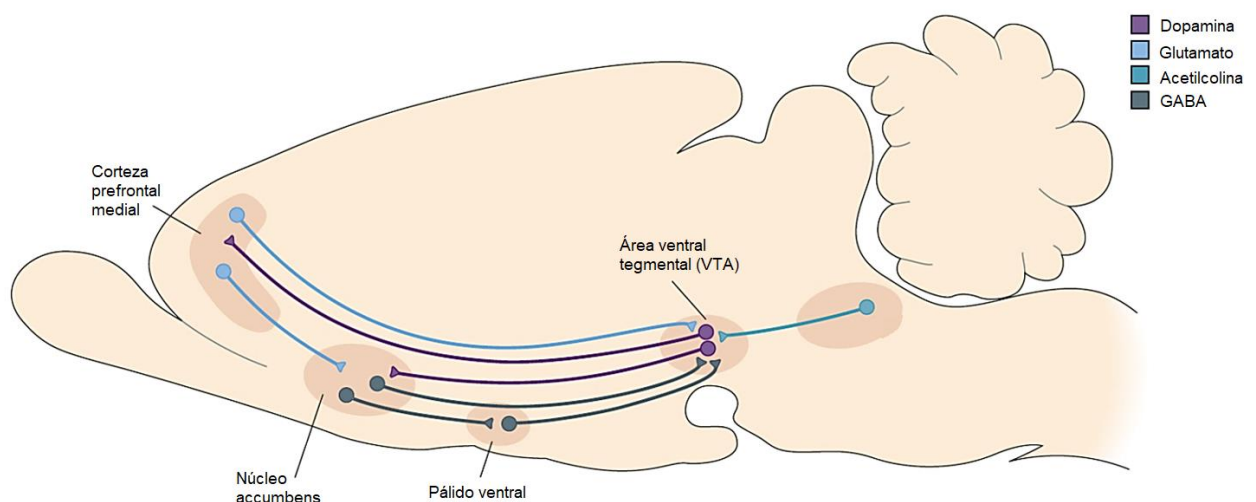


Figura 6. Esquema representativo de las vías neurales implicadas en el circuito de recompensa. En morado, se observan las vías dopaminérgicas provenientes del VTA al

núcleo accumbens, a la mPFC y a otras estructuras del cerebro anterior. En azul están representadas las aferencias gabaérgicas provenientes del tallo cerebral y en gris están representadas las vías glutamatérgicas (Modificado de Kandel et al., 2013).

Con respecto a la conexión entre el VTA y la IC, estudios previos indican que la IC tiene una alta densidad de fibras dopaminérgicas provenientes del VTA que son independientes de las fibras que proyectan a la corteza prefrontal medial (mPFC) (Ohara et al., 2003). Por otra parte, a través de marcaje de la proteína fluorescente amarilla (eYFP) en las neuronas del VTA y sus proyecciones hacia la IC, se observa que eYFP colocaliza con las terminales tirosina hidroxilasa (TH+) provenientes del VTA en la IC (Gil-Lievana et al., 2020) mostrando que hay una conexión importante entre estas áreas.

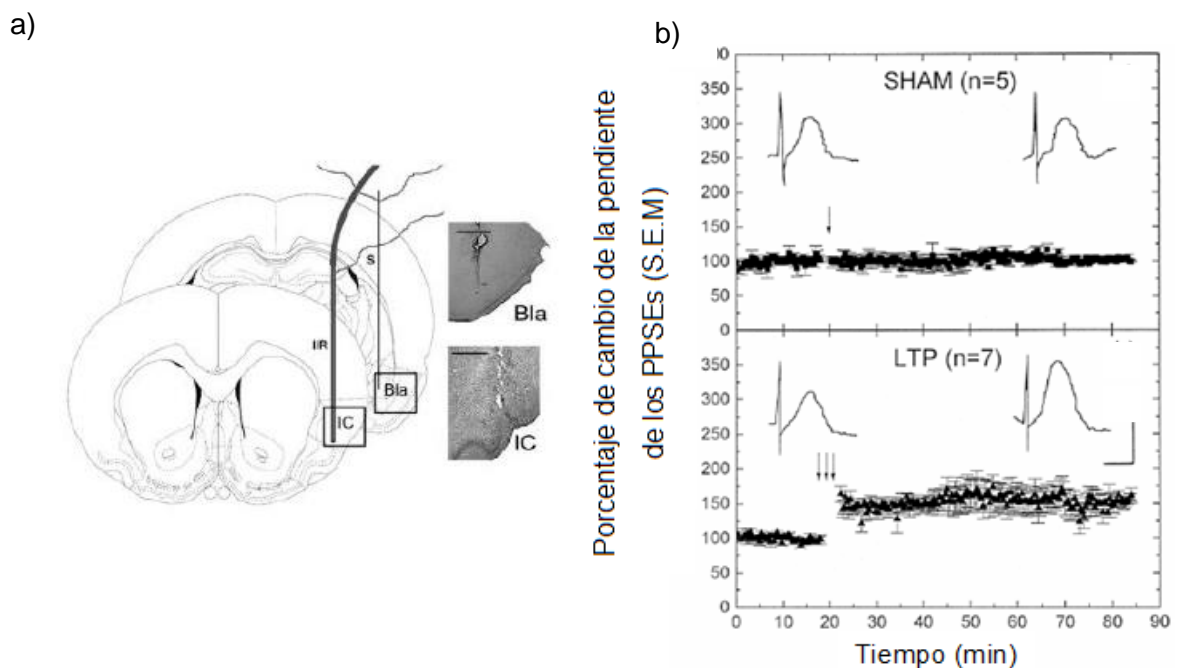


Figura 7. Inducción de LTP en la IC por medio de estimulación de alta frecuencia en la BLA. a) Esquema de la implantación de los electrodos de estimulación y registro en la BLA y la IC, respectivamente. b) Esquema representativo del registro electrofisiológico. En la parte superior se observa el grupo control SHAM donde la estimulación eléctrica no induce LTP. En la figura inferior, se observa el incremento en el porcentaje de las pendientes de los PPSEs que indican la inducción de LTP (Modificado de Escobar y Bermúdez-Rattoni, 2000).

Entender la función cerebral a partir de la actividad de los circuitos neuronales, como el que se describió en líneas anteriores, requiere herramientas que puedan manipular selectivamente la actividad de tipos específicos de células y esto ha sido posible gracias a los recientes avances en tecnologías genéticas y ópticas (Xie,

Jackson y MacDonald, 2013). El desarrollo de la optogenética en el estudio de la LTP permite tener una selección más precisa y controlada de los circuitos.

1.6. Optogenética

La optogenética, como su nombre lo indica, es una técnica que integra a la óptica y la genética lo que permite marcar células específicas de algún tejido vivo y estas pueden ser activadas por luz a ciertas frecuencias (Yizhar, Fenno, Davidson, Mogri y Deisseroth, 2011). En esta técnica, la actividad eléctrica neuronal es controlada por medio de la expresión de una opsina microbial, una proteína de membrana sensible a la luz (Boyden, Zhang, Bamberg, Nagel y Deisseroth, 2005). La selectividad y especificidad alcanzada por la optogenética es fundamental para la caracterización de circuitos neurales (Barnett, Perry, Dalrymple-Alford y Parr-Brownlie, 2018). Los genes que codifican a proteínas sensibles a la luz pueden administrarse a las células de interés, mediante transfección, traducción viral o la creación de animales transgénicos (Yizhar et al., 2011).

El desarrollo de esta técnica ha llevado a la creación de opsinas con diferentes efectos en la actividad neural. Principalmente se ha utilizado la proteína canal de rodopsina - 2 (ChR2) que al ser fotoestimulada en las neuronas induce la despolarización de las células debido a su estructura como canal selectivo de cationes a Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y H^+ . En contraparte, la estimulación de la proteína halorodopsina (HR) induce hiperpolarización por la entrada de aniones como Cl^- (Xie et al., 2013). De este modo, cuando estas opsinas se expresan en la membrana neuronal, pueden ser activadas por una serie de pulsos electromagnéticos en el espectro visible, desencadenando la generación de impulsos eléctricos o potenciales de acción (Boyden et al., 2005, Gradinaru et al., 2007).

Los avances metodológicos en las neurociencias han permitido el estudio funcional de circuitos neuronales con especificidad, precisión temporal y selectividad celular que, hasta hace unos años, no ofrecían las técnicas tradicionales como la electrofisiología y la farmacología. La optogenética combinada con el registro eléctrico se ha convertido en una poderosa herramienta para investigar las relaciones causales entre la actividad y la función del circuito neuronal (Zou et al., 2021).

1.7. Optogenética y el estudio de la plasticidad sináptica *in vivo*

Debido a sus ventajas en el control preciso y específico de poblaciones neuronales, la optogenética, se ha utilizado en el estudio de la plasticidad sináptica en el cerebro *in vitro* e *in vivo* (Adamantidis et al., 2011; Glasgow et al., 2019; Xie et al., 2013). Se ha reportado que la inducción optogenética de LTP a través de la activación de canales de rodopsina modificados genéticamente son más eficientes para responder a altas frecuencias (Bulin et al., 2020; Gunaydin et al., 2010). También mediante la coactivación de manera repetitiva las neuronas pre y postsinápticas (Ma et al., 2018). El uso de canales de rodopsina modificados para la inducción de LTP se observó en un estudio realizado por Bulin y cols. en 2020, donde se llevó a cabo un protocolo para inducir una LTP en la mPFC con estimulación optogenética. Para estos experimentos, fue utilizada una variante del canal de rodopsina-2 con una mutación E123T (ChETA). Esto debido a que su cinética es más rápida y puede ser activada por frecuencias de estimulación más altas, lo que permite una estimulación más eficiente para la inducción de LTP por estimulación optogenética (oLTP) (Gunaydin et al., 2010). La estimulación optogenética de las fibras aferentes del tálamo medial produjo un incremento en las respuestas evocadas en la mPFC (Bulin, Hohl, Paredes, Silva y Morilak, 2020).

Por otro lado, la coactivación simultánea pre y postsináptica para la inducción de LTP optogenética se observó en otro estudio realizado por Ma y cols. en 2018, donde se llevó a cabo la inducción de una LTP *in vivo* por medio de la estimulación simultánea pre y postsináptica. En este experimento, se expresó la proteína canal de rodopsina para estimular tanto las fibras corticales provenientes de la corteza prefrontal medial (mPFC) como los somas del estriado dorso medial (DMS) de manera simultánea. La estimulación optogenética de alta frecuencia (oHFS) en la mPFC en conjunto con la despolarización postsináptica optogenética (oPSD) en neuronas del DMS induce una LTP robusta (ver Figura 8). En contraste, la oHFS de las fibras corticoestriatales o la oPSD por si solas, no inducen LTP. Adicionalmente, esta estimulación simultánea incrementó la respuesta de autoadministración de alcohol en roedores (Ma et al., 2018), mostrando que la LTP de la proyección mPFC-DMS es importante para la adicción al alcohol. Este estudio marca un antecedente directo de la estimulación simultánea por medio de la optogenética para la inducción de LTP en

circuitos implicados en el mantenimiento de conductas de búsqueda asociadas a adicciones.

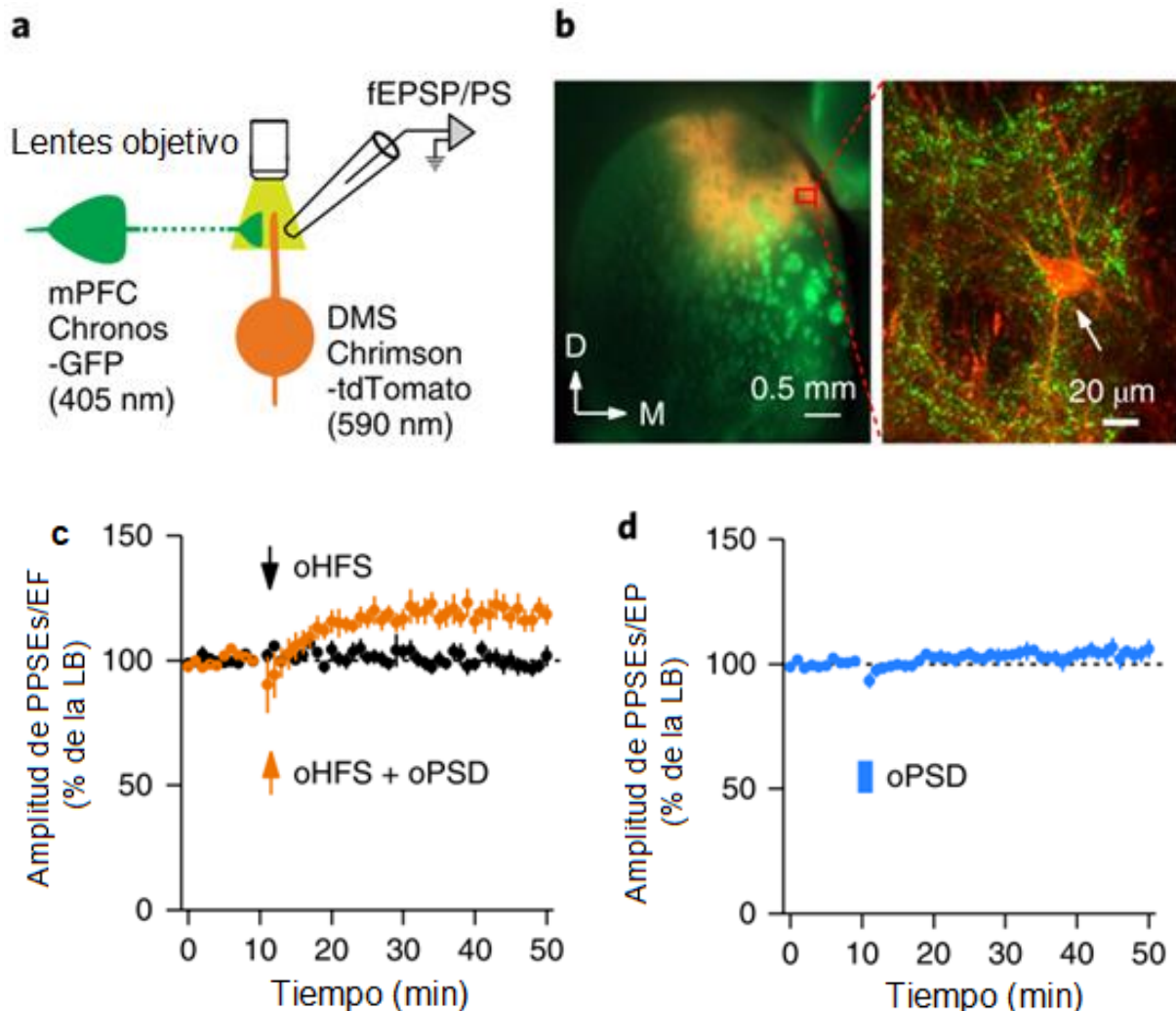


Figura 8. La oPSD facilita la inducción de LTP en el DMS. a) Esquema representativo de la estimulación pre y postsináptica en la sinapsis corticoestriatales del DMS mediante el uso de los canales Chronos (en mPFC) y Chrimson (en DMS). b) Imágenes obtenidas de inmunofluorescencia donde se observan en verde las fibras de mPFC y en rojo las neuronas del DMS para comprobar su conectividad. c) La estimulación conjunta de la oHFS y oPSD induce una LTP en el DMS. Por otro lado, la oHFS no genera cambios. d) La oPSD no induce la LTP (Modificado de Ma et al., 2018).

1.8. Conexiones funcionales en el circuito VTA-BLA-IC

Experimentos previos de nuestro grupo, sugieren que la interconexión de VTA-BLA-IC podría estar involucrada en el mantenimiento de memorias adictivas. Para caracterizar la relación funcional entre el VTA y la IC, en el estudio de Gil y cols. en

2020, se llevó a cabo un protocolo de microdiálisis para determinar la concentración extracelular de DA, NA, glutamato y ácido gamma- aminobutírico (GABA) en la IC en ratones en libre movimiento durante la fotoactivación de las neuronas TH+ en el VTA. Los resultados muestran que durante la fotoactivación hay un incremento en la concentración de dopamina (ver Figura 9). Este resultado indica que hay una relación funcional entre el IC y el VTA.

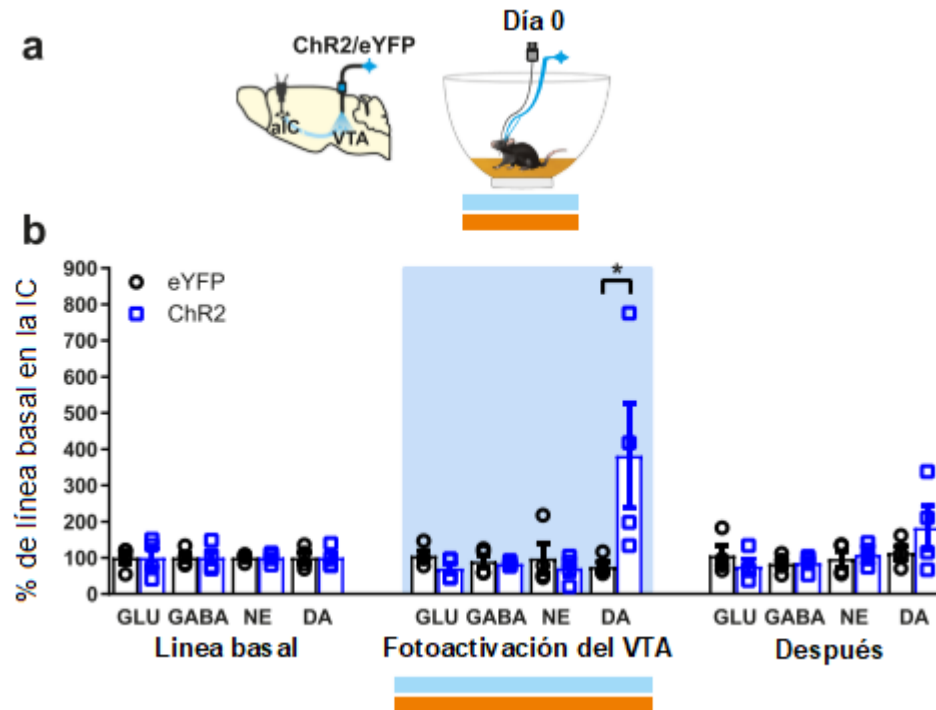


Figura 9. La fotoactivación de TH+ en el VTA induce la liberación de dopamina en la IC. a) Esquema representativo de la foto estimulación en el VTA y la toma de muestras por micro diálisis en la IC. b) Concentración extracelular de los neurotransmisores comparados con la línea base antes, durante y después de la fotoactivación en el VTA. Se observa el incremento de la concentración de DA durante la estimulación en VTA en los ratones que fueron infectados con ChR2 (Modificado de Gil-Lievana et al., 2020).

De manera interesante, también existe una relación funcional de la proyección BLA-IC en la formación de las memorias adictivas. Mediante un protocolo de condicionamiento de preferencia de lugar (CPP), tarea que consiste en la asociación de estímulos recompensantes con pistas contextuales (Akins, Eaton y Bolin, 2017), se observó que la fotoinhibición de las proyecciones de la BLA hacia la IC promovieron una extinción acelerada del CPP (ver Figura 10). Estos resultados marcan el

antecedente directo de la participación anatómica y funcional de estas estructuras en el mantenimiento de una memoria adictiva.

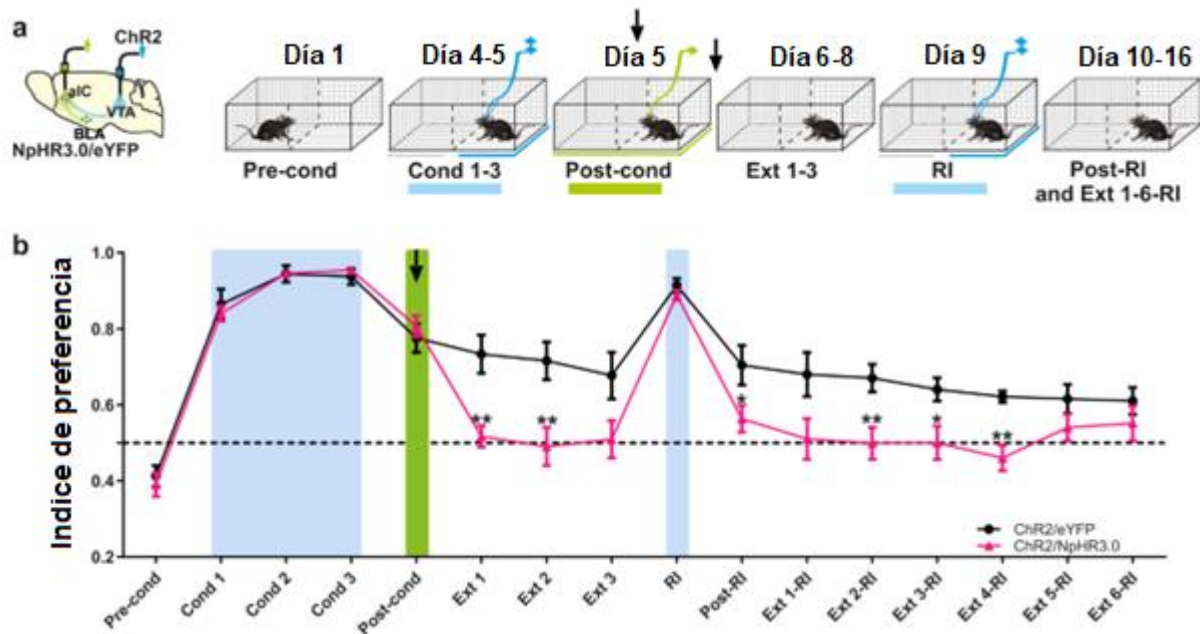


Figura 10. La fotoinhibición de las fibras provenientes del BLA a la IC acelera la extinción del CPP. a) A la izquierda se muestra un diagrama representativo de la foto estimulación en el VTA y la fotoinhibición de las fibras provenientes de la BLA en la IC. A la derecha se muestra un diagrama del protocolo conductual. La barra azul representa la foto activación en el VTA y la barra verde representa la fotoinhibición de las fibras de la BLA a la IC. b) La fotoinhibición de las fibras durante el post-condicionamiento, acelera la extinción de la conducta (Modificado de Gil-Lievana et al., 2020).

Los antecedentes presentados en este proyecto sugieren que la conexión funcional del VTA y la BLA con la IC es relevante para el mantenimiento de memorias adictivas, sin embargo, los mecanismos plásticos implicados en este proceso conductual quedan por ser determinados. El uso conjunto de la estimulación optogenética y la electrofisiología nos permitirá observar los cambios en la eficiencia sináptica en respuesta a la estimulación optogenética en tiempo real y extender nuestro entendimiento sobre la maquinaria celular y molecular que subyace estos procesos.

2. Planteamiento del problema

La propuesta de este proyecto forma parte de una investigación que busca dilucidar los mecanismos celulares y moleculares de la circuitería VTA-BLA-IC en la formación y mantenimiento de las memorias asociadas a conductas adictivas dependientes del contexto.

La LTP es una forma de plasticidad sináptica dependiente de la actividad neural que resulta en el incremento de la fuerza de transmisión sináptica. No obstante, las técnicas convencionales para la inducción de LTP tienen diversas limitaciones como la falta de control selectivo de poblaciones neuronales y sus proyecciones. Por ello, en este proyecto proponemos un protocolo para la inducción de LTP combinando la estimulación de fibras dopaminérgicas provenientes del VTA y fibras catecolaminérgicas provenientes de la BLA. Con este modelo conoceremos la interacción entre el circuito VTA – IC – BLA durante la inducción de plasticidad sináptica.

Además, la inducción de plasticidad neuronal por medio de la estimulación optogenética nos brinda un acercamiento a entender fenómenos plásticos asociados a la persistencia de memorias asociadas a conductas adictivas mediante la precisión y mejora de los modelos tradicionales del estudio de la plasticidad sináptica además de dar un antecedente para su estudio en tiempo real en paradigmas conductuales.

2.1. Objetivo general

Inducir una LTP en la corteza insular a través de la fotoestimulación optogenética simultánea y por separado de las fibras provenientes del VTA y de la BLA.

2.2. Objetivos particulares

- Inducir una LTP en la corteza insular por medio de estimulación optogenética simultánea de las fibras provenientes del VTA y la BLA.
- Explorar la inducción de la LTP en la corteza insular por medio de estimulación optogenética de las fibras provenientes del VTA.
- Explorar la inducción de la LTP en la corteza insular por medio de la estimulación optogenética de las fibras provenientes de BLA.

2.3. Hipótesis

- La estimulación optogenética simultánea de terminales provenientes de VTA y BLA inducirá plasticidad sináptica en la IC.
- La estimulación optogenética de las fibras provenientes de VTA no inducirán plasticidad sináptica en la IC.
- La estimulación optogenética de las fibras provenientes de BLA no inducirán plasticidad sináptica en la IC.

3. Metodología

3.1. Animales

Se utilizaron ratones transgénicos jóvenes TH-Cre (Tirosina hidroxilasa, F112 line) entre 3 – 4 meses. Los ratones transgénicos de la cepa TH-Cre (<https://www.jax.org/strain/008601>) tienen un promotor de tirosina hidroxilasa que dirige la expresión de la recombinasa Cre en las células catecolaminérgicas. Los animales fueron alojados en cajas individuales en cajas de acrílico con ciclos controlados 12h luz / 12h oscuridad, las manipulaciones fueron llevadas a cabo durante el periodo de luz, temperatura entre 22° a 24° y acceso a comida y agua ad libitum dentro del vivarium del Instituto de Fisiología Celular.

El protocolo de esta tesis se desarrolló de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del IFC (CICUAL, número FBR 30-14). En total, fueron empleados 32 animales. Para los grupos en donde se llevó a cabo estimulación optogenética en el VTA, se emplearon animales TH-Cre, que en total fueron 21 animales distribuidos en 4 grupos. Para los grupos en donde solo se estimuló optogenéticamente el BLA, se emplearon animales WT, que en total fueron 11 animales distribuidos en 2 grupos (véase figura 11). La distribución de los grupos será descrita en el diseño experimental.

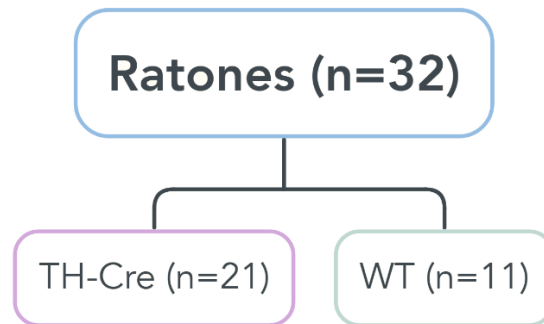


Figura 11. Distribución de animales empleados en los experimentos. TH-Cre: Ratones transgénicos que expresan TH bajo la expresión de Cre recombinasa. WT: Ratones silvestres de tipo B6129F2.

3.2. Genotipificación

La genotipificación es un proceso utilizado en la biología molecular para la determinación de variantes genéticas que posee un organismo. Determina diferencias en una secuencia de ADN específica que puede utilizarse como marcadores para identificar genes relevantes para un rasgo particular (Rowan, Seymour, Chae, Lundberg, y Weigel, 2017) . Uno de los protocolos más empleados es el uso de una reacción en cadena de la polimerasa de punto final (PCR, por sus siglas en inglés), que es una reacción enzimática que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos en los que la secuencia es copiada de forma fiel (Dios, Ibarra y Velasquillo, 2013).

Para asegurar que los ratones a utilizar fueran TH-Cre, se utilizó el método Hot SHOT para la extracción de ADN. El método consiste en lisis de 1 mm de cola del ratón con una solución alcalina (NaOH 25mM, disodio EDTA 0.2 mM) a temperatura de 95° C por una hora para posteriormente neutralizarlo con un buffer (Tris-HCl 1M, pH 7.5) y finalmente se somete a centrifugación a 2500 rpm por 2 minutos, donde se recupera el sobrenadante que contiene el ADN.

Después de la extracción de ADN, se llevó a cabo una PCR para la amplificación de la secuencia específica de ADN. Las secuencias de oligómeros utilizados para el PCR son Cre reverso 5' GGTTTCCCGCAGAACCTGAA y Cre hacia adelante 5'AGCCTGTTTTGCACGTTCCACC. Una vez obtenidos los productos de la PCR, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio para determinar el genotipo de los ratones a través de los productos observados en el gel.

3.3. Infusión estereotáxica de virus

Los vectores virales adenoasociados recombinantes (rAVV) se utilizan como vehículos para la transducción de material genético como es el ADN (ácido desoxirribonucleico) a poblaciones específicas de células en presencia de un virus auxiliar como un adenovirus (Ad). Al fusionarse, el rAVV sufre una replicación del genoma y hace posible la transducción a las células de interés (Chen, Keiser, y Davidson, 2018).

La cirugía estereotáxica, es una técnica quirúrgica que utiliza un sistema de coordenadas para la localización de zonas particulares del SN. Se toma como referencia un atlas de cerebro de ratón que muestra secciones coronales y sagitales medidas en milímetros (Franklin y Paxinos, 2008). El uso estandarizado de la cirugía estereotáxica permite la infusión de tratamientos y diferentes manipulaciones del SN con precisión y sin dañar el tejido.

Para llevar a cabo la inducción de la LTP por medio de estimulación optogenética, se infundió los rAVV mediante el procedimiento estereotáxico estandarizado, obtenidos de la Universidad de Carolina del Norte (UNC). El ratón fue anestesiado con isoflurano e inyectado unilateralmente con rAVV (0.5 μ l) por 5 minutos para su completa difusión. La infusión fue llevada a cabo por medio de capilares para microinyección.

En los ratones TH-Cre, se administró de forma unilateral el constructo Cre-inducible asociado a adeno virus (AAV) el gen de la proteína canal de rodopsina - 2 (ChR2) fusionado con la proteína amarillo fluorescente (eYFP) o el constructo AAV reportero con la proteína eYFP en el VTA que corresponde a una concentración viral de 5.2×10^{12} moléculas de virus ml^{-1} para rAAV5/Efl α -DIO-hChR2(H134R)-eYFP (ChR2+). Por otra parte, se inyectó el constructo AAV reportero con la proteína eYFP en el VTA, es decir, 6.0×10^{12} moléculas de virus ml^{-1} para rAAV5/Efl α -DIO- eYFP (ChR2-) (ver figura 12).

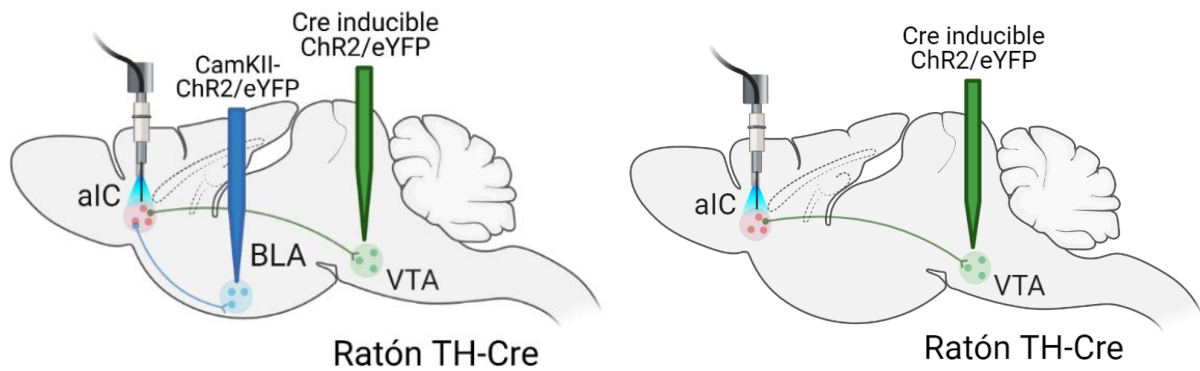


Figura 12. Esquema de infusión de virus en VTA y zona de estimulación. a) Esquema de la inyección de virus AAV unilateral de CamKII-ChR2-eYFP o proteína reportera EYFP en el BLA (azul) y la inyección de virus AAV unilateral ChR2-eYFP o proteína reportera EYFP en el VTA (verde). b) Esquema de la inyección de virus AAV unilateral ChR2-eYFP o proteína reportera EYFP en el VTA (verde).

Para la infección en BLA, se administró el constructo AAV bajo el promotor CamKII de forma unilateral, el gen de la proteína canal de rodopsina – 2 (ChR2) fusionado con la proteína amarillo fluorescente (eYFP) que corresponde a una concentración viral 5.1×10^{12} moléculas de virus para rAAV- CamKII- hChR2-eYFP (ChR2+) y 5.1×10^{12} moléculas de virus para rAAV- CamKII -eYFP- (ChR2-). Las coordenadas de infección en BLA (desde Bregma (mm): -2.05 AP, -3.4 ML y 5.3 DV) y VTA (-3.08 AP, - 0.6 ML y 4.8 DV). La infección tarda entre 25 a 30 días (ver figura 13).

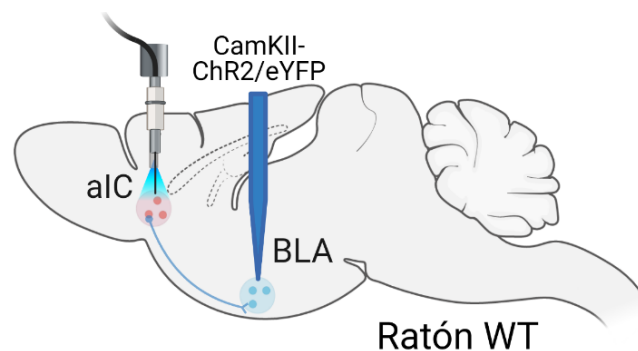


Figura 13. Esquema de infusión de virus en BLA y zona de estimulación. Esquema de la inyección de virus AAV unilateral de CamKII-ChR2-eYFP o proteína reportera EYFP en el BLA (azul).

3.4. Inducción de potenciación de largo plazo optogenética (oLTP)

Como se describió previamente, la LTP es una expresión de plasticidad que puede ser inducida experimentalmente por medio de estimulación eléctrica,

produciendo un incremento duradero en la amplitud y pendiente de los potenciales postsinápticos excitatorios (PPSEs) (Lamprecht y LeDoux, 2004). La inducción de LTP requiere de la activación de las neurona pre- y postsináptica, que puede ser obtenida a través de la estimulación óptica de poblaciones neuronales independientes (Klapoetke et al., 2014). La utilización de la optogenética para el estudio de mecanismos plásticos permite una mayor precisión y se acerca más al fenómeno fisiológico, cubriendo las limitaciones de la electrofisiología tradicional (Xie et al., 2013).

Para este protocolo, se llevó a cabo la infusión de AAV5-CamKII-ChR2-eYFP en BLA y ChR2-eYFP en VTA en ratones TH-Cre como se describió anteriormente. Después de 4 semanas de recuperación, los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (47.5 mg/kg, i.p.) y colocados en el estereotáxico para llevar a cabo el procedimiento de inducción de la LTP. Por medio de un optrodo colocado en IC (desde Bregma (mm): +1.1 AP, -3.3 ML, -2.75 DV) se obtuvieron las respuestas corticales evocadas por la fotoestimulación simultánea de las fibras provenientes de BLA – IC y VTA-IC. Las respuestas evocadas fueron digitalizadas para su análisis en el software especializado SciWorks (Datawave Co.). Los siguientes parámetros fueron empleados para la inducción optogenética de LTP (oLTP): 20Hz, 5s ON/5s OFF, 10 min. Se registró una línea base de 10 minutos previa a la estimulación y las repuestas evocadas se registraron durante 60 minutos después de la fotoestimulación (ver figura 14).

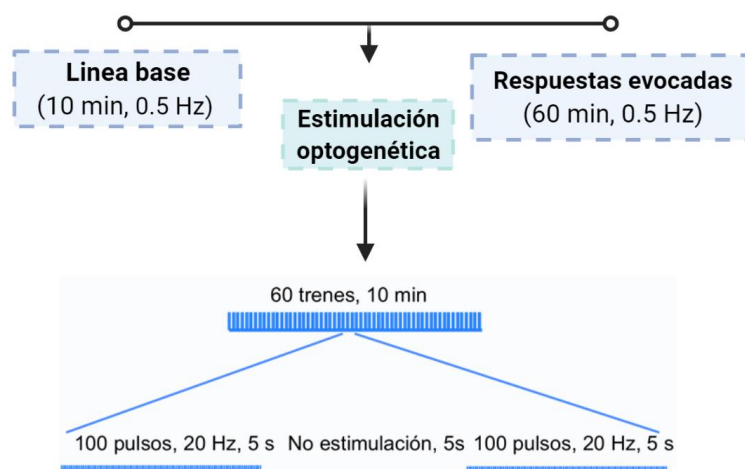


Figura 14. Esquema de protocolo de estimulación optogenética (60 trenes de 100 pulsos de 20Hz). Hz: Hertz, s: segundos.

3.5. Análisis inmunohistoquímico

La inmunohistoquímica (IHC) es una técnica empleada para la clasificación y diagnóstico de células, esto mediante el uso de anticuerpos responsivos a ciertos antígenos en tejidos y células específicas que permiten la determinación del tipo celular y su origen, comúnmente detectado a través de un microscopio óptico (Magaki, Hojat, Wei, So, y Yong, 2019). Una de las técnicas más empleadas es la inmunofluorescencia (IF) que permite la detección antígenos en diferentes tejidos mediante la combinación de anticuerpos específicos marcados con fluoróforos (Im, Mareninov, Fernando, Diaz, y Yong, 2019). Posteriormente a la preparación, para la detección de fluorescencia, el uso del microscopio de fluorescencia confocal permite obtener imágenes de alta resolución para la localización de proteínas o antígenos de interés, esto mediante luz a determinada longitud de onda que viaja a través de la lente y un espejo hacia la cámara para obtener así las fotografías correspondientes para su análisis posterior (Jove Science Education Database, 2021).

Los animales fueron anestesiados con una sobredosis letal de pentobarbital y por medio de una perfusión cardiaca, con 10 ml de NaCl 0.9%, seguido de paraformaldehído al 4%, pH 7.4. Posteriormente fue extraído el tejido y los cerebros estuvieron en paraformaldehído por 24 horas antes de ser transferidos a sacarosa al 30%. El tejido fue congelado en Tissue-Tek (VWR, Chicago, IL, USA) y cortado de forma coronal utilizando el criostato (Leica Biosystems, Richmond, USA) en secciones delgadas de 40 μm .

Los cortes fueron seleccionados para su tratamiento de inmunofluorescencia. Los cortes fueron sometidos a 3 lavados con solución buffer trizma base y NaCl 0.9%, pH 7.4 (TBS) durante 10 minutos por cada lavado seguido de la exposición a ácido fórmico durante 5 minutos. Posteriormente, se realizaron lavados de 10 minutos en una solución de TBS más Tritón 0.1% y consecutivamente se mantuvieron en una solución de bloqueo TBS 0.1M, pH 1.4, tritón 0.1% y BSA 5%, albumina bovina sérica durante 30 minutos. Se realizaron 3 lavados de 10 minutos previos a la incubación con el anticuerpo primario anti-rabbit TH policlonal (Pel-Freez, Rogers, AR) disuelto en una solución de bloqueo por 24 horas a 4°C en agitación. Se realizaron 6 lavados de 10 minutos con TBS previo a la incubación del anticuerpo secundario anti-goat CY3 (Millipore, Darm-Stadt, Alemania) disuelto en una solución sérica por 2 horas protegido de la luz a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados de 10 minutos en TBS

donde posteriormente fueron expuestos durante 30 segundos a DAPI 0.3 μ M en TBS seguido de 3 lavados con TBS de 10 minutos cada uno. Finalmente, los cortes fueron montados en laminillas silanizadas Superfrost Plus utilizando el medio de montaje para fluorescencia (Dako; Carpinteria, EUA.).

3.6. Diseño experimental

3.6.1. Estimulación optogenética de las fibras provenientes de la BLA y del VTA en IC.

Con el objetivo de observar si la fotoestimulación simultánea de las fibras provenientes del VTA y de la BLA inducen una LTP en la IC, los animales fueron divididos en los siguientes grupos que se describen a continuación. Adicionalmente, en la figura 11 se presenta un esquema del diseño experimental.

- **Grupo oBLA + oVTA (n=6):** Un grupo de ratones transgénicos TH-Cre previamente identificados mediante la genotipificación por PCR, fueron sometidos a una cirugía estereotáxica, anteriormente descrita, para infundirlos con AAV5-CamKII-ChR2-eYFP en las coordenadas correspondiente a la BLA y AAV5-ChR2-eYFP en la zona del VTA. Después de la recuperación e incubación del virus (4 semanas) se llevó a cabo la inducción de potenciación a largo plazo previamente descrito. Tras el establecimiento de una línea base de 10 minutos, se aplicó la fotoestimulación y se registraron las respuestas evocadas por 60 minutos. Posteriormente, se analizó el tejido mediante inmunofluorescencia.
- **Grupo eYFPBLA + eYFPVTA (n=5):** Un grupo de ratones transgénicos TH-Cre fueron infundidos con una proteína reportera AAV5- eYFP en VTA y con AAV5- CamKII -eYFP en BLA. Se aplicó un protocolo de inducción de oLTP descrito anteriormente, y se llevó a cabo el análisis.

3.6.2. Estimulación optogenética de las fibras provenientes de la BLA en la IC.

Se ha descrito anteriormente la relación funcional y anatómica entre la BLA y la IC y la estimulación de alta frecuencia en la BLA induce potenciación a largo plazo en la IC (Escobar y Bermúdez-Rattoni, 2000). Para descartar que la actividad del BLA por si sola genera LTP en la CI, se utilizaron los siguientes grupos experimentales:

- **Grupo oBLA (n=5):** Un grupo de ratones WT fueron infundidos con AVV5-CamKII-ChR2-eYFP en BLA, con el objetivo de activar por medio de la

fotoestimulación las fibras provenientes de la BLA. Se aplicó un protocolo de inducción de oLTP descrito anteriormente.

- **Grupo oBLA + eYFPVTA (n=6):** Un grupo de ratones WT fueron infundidos con AAV5-CamKII-ChR2-eYFP en BLA y AAV5-CamKII-ChR2-eYFP, esto con el objetivo de contrastar el efecto de la condición con CHR2 en BLA. Se aplicó un protocolo de inducción de oLTP que ha sido escrito anteriormente.

3.6.3. Estimulación optogenética de las fibras provenientes del VTA en la IC.

En estudios recientes, se ha reportado que la fotoestimulación del VTA, promueve la liberación de dopamina en la IC (Gil-Lievana et al., 2020), mostrando una relación funcional entre estas zonas. Para descartar que la actividad del VTA por si sola genera LTP en la CI, se utilizaron los siguientes grupos experimentales:

- **Grupo oVTA (n=5):** Un grupo de ratones transgénicos TH-Cre fueron infundidos con AAV5-ChR2-eYFP en VTA para poder estimular las fibras provenientes del VTA en la IC. Se aplicó un protocolo de inducción de oLTP previamente descrito.
- **Grupo oVTA + eYFPBLA (n=5):** Un grupo de ratones transgénicos TH-Cre fueron infundidos con AAV5-ChR2-eYFP en el VTA y con AAV5-CamKII-eYFP en la BLA, con la finalidad de generar una comparación entre ambas condiciones. Posteriormente, se aplicó un protocolo de inducción de oLTP previamente descrito.

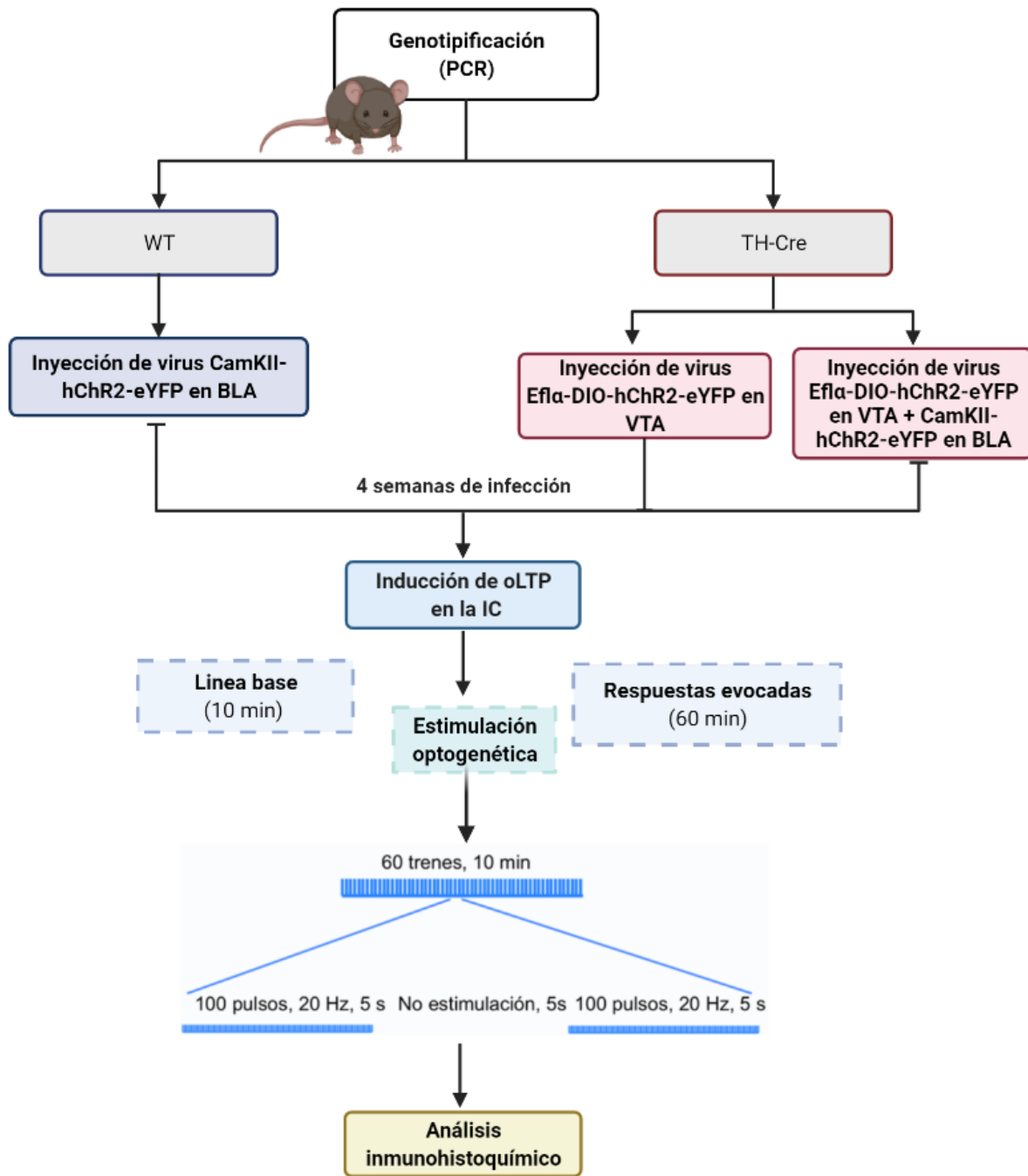


Figura 15. Visión esquemática del procedimiento experimental. WT: Wild type, TH-Cre: Ratones de la cepa inducible Cre bajo el promotor de tirosina hidroxilasa, BLA: Amígdala Basolateral, ChR2: proteína canal de rodopsina – 2, EYFP: proteína amarilla fluorescente, VTA: área ventral tegmental, oLTP: potenciación a largo plazo inducida con optogenética.

3.7 Análisis estadístico

El análisis de datos se llevó a cabo en el software Prism Graph 8.0. Para el análisis de datos obtenidos del protocolo de inducción optogenética de la LTP, se realizó una base de datos por grupo. Para verificar si los datos se distribuían de manera normal se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y para identificar si existía igualdad de varianzas entre los grupos se realizó la prueba de Levene. Para el análisis de datos de los experimentos electrofisiológicos, se llevó a cabo una prueba de ANOVA de medidas repetidas para dos factores. Consideramos como factor intra-sujetos, a la medida de las pendientes obtenidas en la línea base (10 minutos) y después de la estimulación (últimos 30 minutos después de la fotoestimulación). Las pendientes se midieron en el tiempo que va del inicio de la estimulación hasta la cresta de los PPSEs. Es importante resaltar que para el análisis se utilizaron estos últimos 30 minutos para comparar la LTP cuando ya no había cambios en la eficiencia sináptica. Como factor inter-sujeto, se tomaron a los diferentes grupos que fueron utilizados para el protocolo y que fueron descritos anteriormente. Posterior a los análisis, se empleó una prueba pos-hoc de Fisher para hacer las comparaciones entre las diferentes condiciones experimentales. Se consideraron significativos los datos con una $p = < 0.05$.

4. Resultados

4.1. Proyecciones en la corteza insular provenientes de la amígdala basolateral y del área ventral tegmental.

Para comprobar que se llevó a cabo la infección de los constructos virales en el VTA y la BLA se realizó inmunohistoquímica contra tirosina hidroxilasa (TH) en cortes coronales de ambas estructuras. En la figura 16a, en rojo, vemos el marcaje de células TH+ del VTA, en verde se observa la señal de la proteína eYFP, en azul el marcaje de los núcleos y en el MERGE de estas señales vemos la colocación de ambas señales, indicando que la infección fue específica para las neuronas catecolaminérgicas en el VTA. Adicionalmente, para comprobar que la infección en los núcleos del VTA proyectan a la IC, se realizó la inmunohistoquímica de cortes coronales de la corteza insular contra TH, sitio donde se llevó a cabo la estimulación y registro de las respuestas evocadas por la estimulación optogenética. Se observaron las proyecciones catecolaminérgicas de las neuronas provenientes del VTA y las terminales marcadas en verde en la IC (Figura 16b).

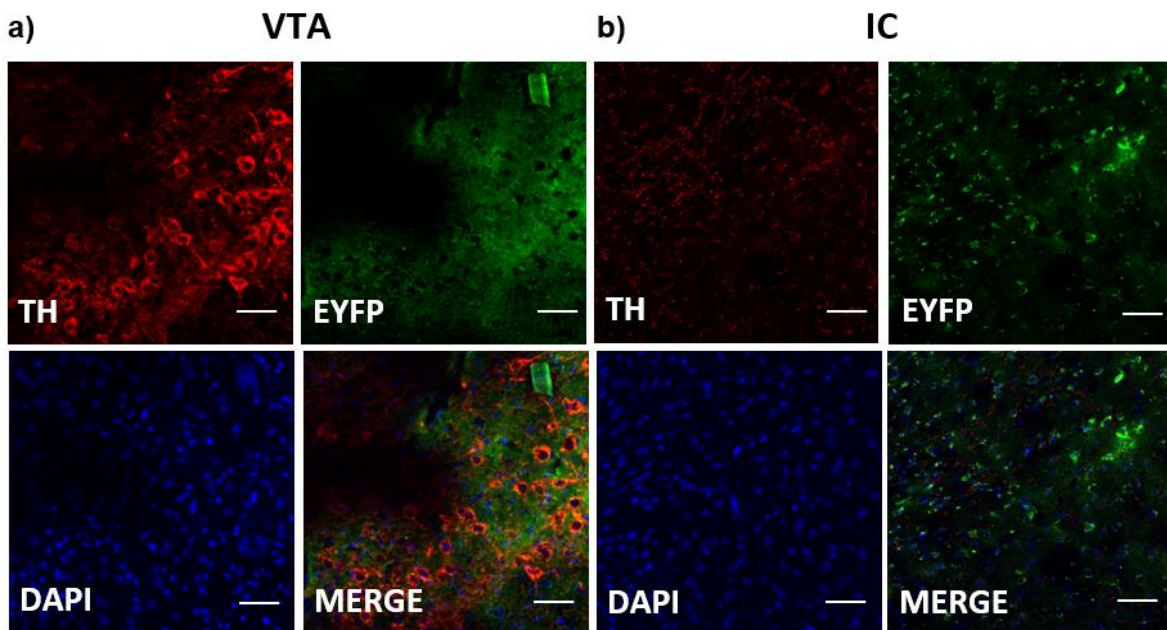


Figura 16. Proyecciones de la IC provenientes del VTA. Imágenes inmunofluorescencia TH (rojo), diclorhidrato de 4',6-diamidina-2'-fenilindol (DAPI, azul) y eYFP (verde) en los somas de VTA (a) y en sus proyecciones a la IC (b). En el merge se muestra la colocalización.

Por otra parte, al analizar el BLA, se observa la co-localización de las neuronas del BLA con la señalización de la proteína eYFP lo que sugiere la infección en la zona indicada (Figura 17a) y sus proyecciones en la IC (Figura 17b).

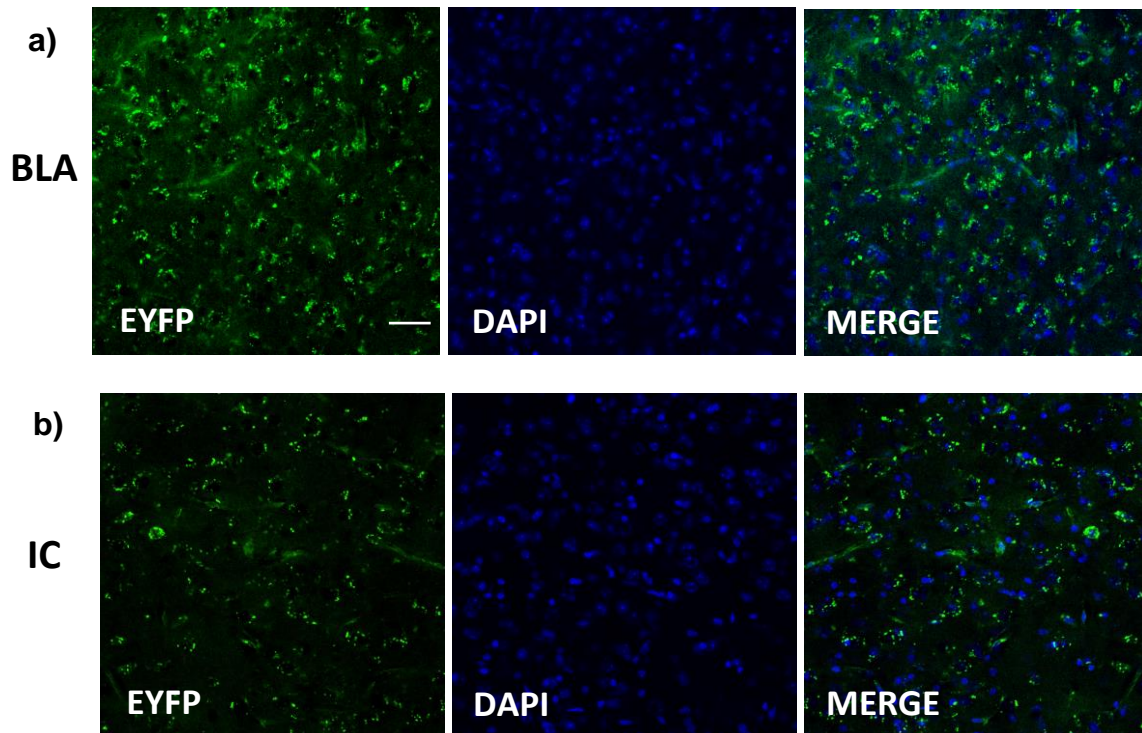


Figura 17. Proyecciones de la IC provenientes de la BLA. Imágenes representativas de inmunofluorescencia doble. eYFP (verde) los somas del BLA y DAPI (azul) en los somas del BLA (a) y en sus proyecciones a la IC (b).

4.2. Efecto de la estimulación optogenética simultánea de las fibras provenientes del VTA y BLA en la IC.

Para determinar el efecto de la estimulación de las proyecciones dopaminérgicas en la IC proveniente del VTA en conjunto con la estimulación de las fibras glutamatérgicas provenientes del BLA en la inducción de la LTP, se realizó la administración de forma unilateral el constructo Cre-inducible asociado a adeno virus (AAV) el gen de la proteína canal de rodopsina - 2 (ChR2) fusionado con la proteína amarillo fluorescente (eYFP) o el constructo AAV reportero con la proteína eYFP en el VTA en ratones TH-Cre. Para la infección en BLA, se administró el constructo AAV bajo el promotor CamKII de forma unilateral, el gen de la proteína canal de rodopsina - 2 (ChR2) fusionado con la proteína amarillo fluorescente (eYFP). Cuatro semanas después de la infección se realizó un protocolo de inducción de la LTP en la IC. Para

la estimulación optogenética de las proyecciones del VTA y la BLA, se colocó el electrodo de registro en el mismo sitio que la férula de fibra óptica en la IC y un electrodo de estimulación eléctrica en la BLA (figura 19a).

La respuesta característica de esta señal, la cual fue inducida por pulsos monofásicos de 50 – 70 mA y 0.25 ms de duración, inició de 2 a 3 ms y presentó su cresta a los 7-10 ms aproximadamente. La amplitud promedio de los potenciales de campo (PPSE) fue de 0.36 ± 0.15 mV (figura 18).

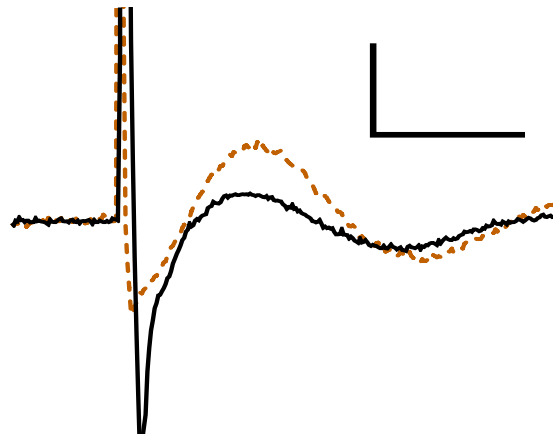


Figura 18. PPSEs en la CI. Los trazos muestran ejemplos de los PPSEs durante la línea base de 10 minutos previo a la estimulación (Línea sólida), y 60 minutos después de la estimulación optogenética simultánea de las proyecciones del BLA y del VTA (Línea punteada). Escala: 10 ms, 0.5 mV.

Nuestros resultados indican que la estimulación simultánea de las fibras del VTA y BLA, induce una LTP en la CI. En el grupo oVTA + oBLA, se observa un incremento en la eficiencia sináptica en la IC 20 minutos después de la estimulación (**$126.5 \pm 0.31\%$**) con respecto a la línea base (Figura 19b). En contraste, en los animales que fueron inyectados solo con proteína reportera en ambas zonas (eyfpVTA + eyfpBLA), no se observa un incremento en la eficiencia sináptica ($103.7 \pm 0.45 \%$) (Figura 19c). Estos resultados nos indican que la estimulación optogenética simultánea de las fibras del VTA y del BLA induce una LTP en la IC 20 minutos después de la estimulación.

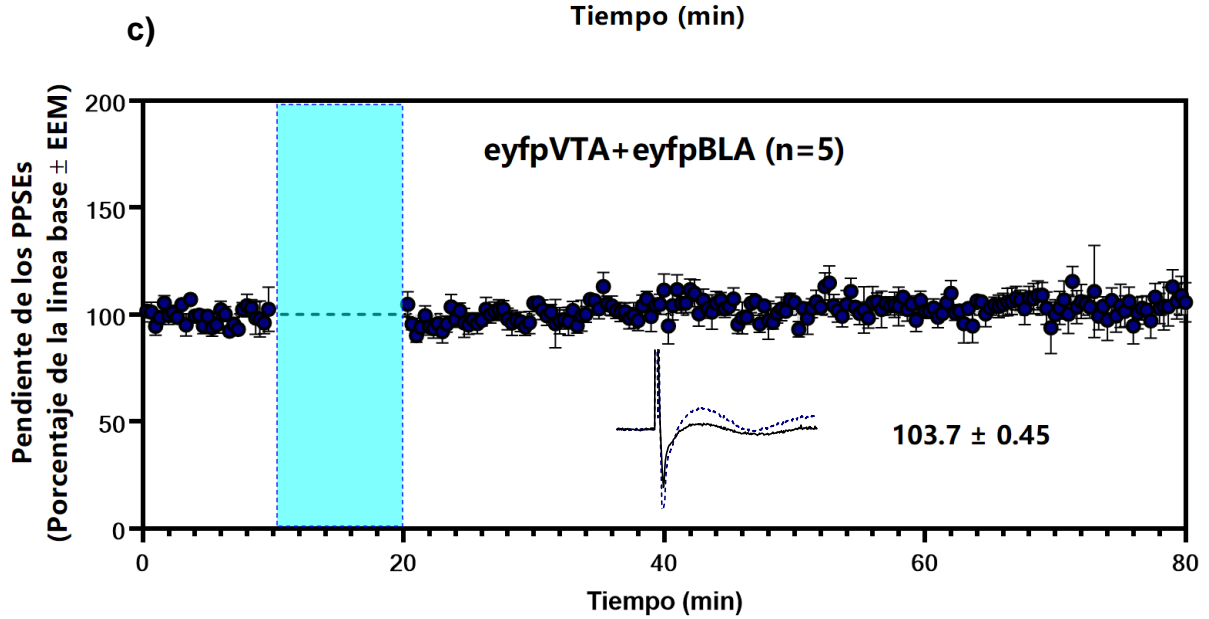
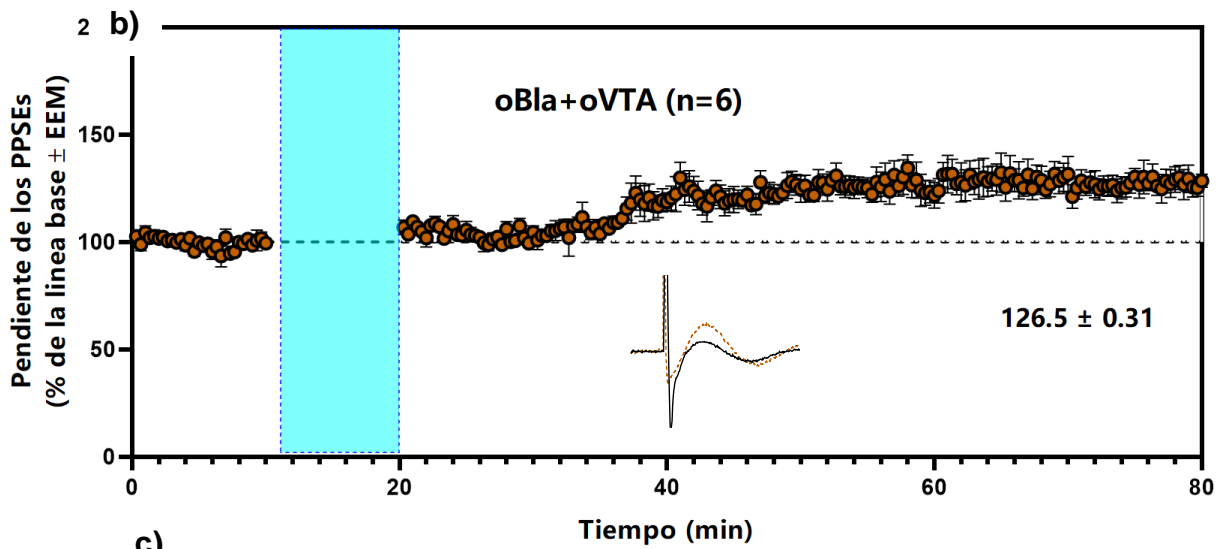
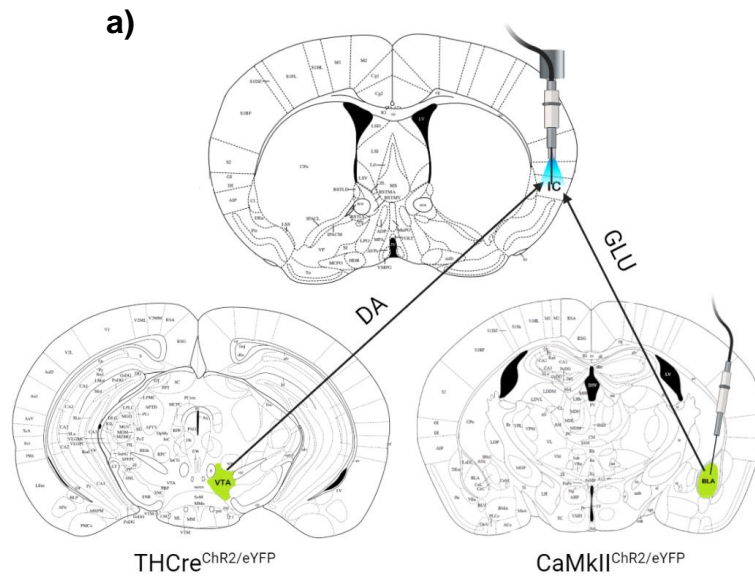


Figura 19. La estimulación optogenética simultánea de las fibras provenientes del VTA y BLA induce una potenciación a largo plazo demorada en la IC. a) Representación esquemática de la colocación de electrodos en el BLA (electrodo de estimulación) y en la IC (electrodo de registro y fibra óptica). b y c) Gráfica de la media de los porcentajes de los PPSEs antes y después del protocolo de estimulación optogenética en la aIC, el sombreado azul representa el tiempo en el cual se realizó el encendido del láser 532 nm a pulso continuo a 10-15 mW en ratones administrados en (b) VTA y BLA con ChR2-eYFP y (c) EYFP. Abajo de cada gráfica se muestra el trazo representativo de las señales obtenidas en la línea base (línea sólida) y los últimos 30 min después de la estimulación (línea punteada).

4.3. Efecto de la estimulación optogenética de las fibras provenientes del VTA en la IC.

Para determinar el efecto de la estimulación de las proyecciones dopaminérgicas en la IC proveniente del VTA en la plasticidad sináptica, se realizó la administración de forma unilateral el constructo Cre-inducible asociado a adeno virus (AAV) el gen de la proteína canal de rodopsina - 2 (ChR2) fusionado con la proteína amarillo fluorescente (eYFP) o ChR2 en VTA y el constructo AAV reportero con la proteína eYFP en el BLA en ratones TH-Cre. Para la estimulación optogenética, se colocó el electrodo de estimulación eléctrica en la BLA y el electrodo de registro junto a la fibra óptica en la IC (Figura 20a).

Al realizar la estimulación, se observó que el grupo donde fueron estimuladas las fibras provenientes de VTA (oVTA) no induce cambios en la eficiencia sináptica ($99.91 \pm 0.19 \%$) comparado con la línea basal (Figura 20b). De manera similar, se observa que en el grupo que fue administrado con el constructo viral con el gen reportero EYFP en la BLA, no se observan cambios en la eficiencia sináptica (103.1 ± 0.39) (Figura 20c).

Nuestros resultados son congruentes con experimentos electrofisiológicos previos, donde se reportó que las respuestas electrofisiológicas en neuronas del IC fueron bajas ante la estimulación de neuronas TH+ del VTA (Gil-Lievana et al., 2020). Este resultado sugiere, que la estimulación optogenética solo de las fibras provenientes del VTA en la IC no induce una LTP.

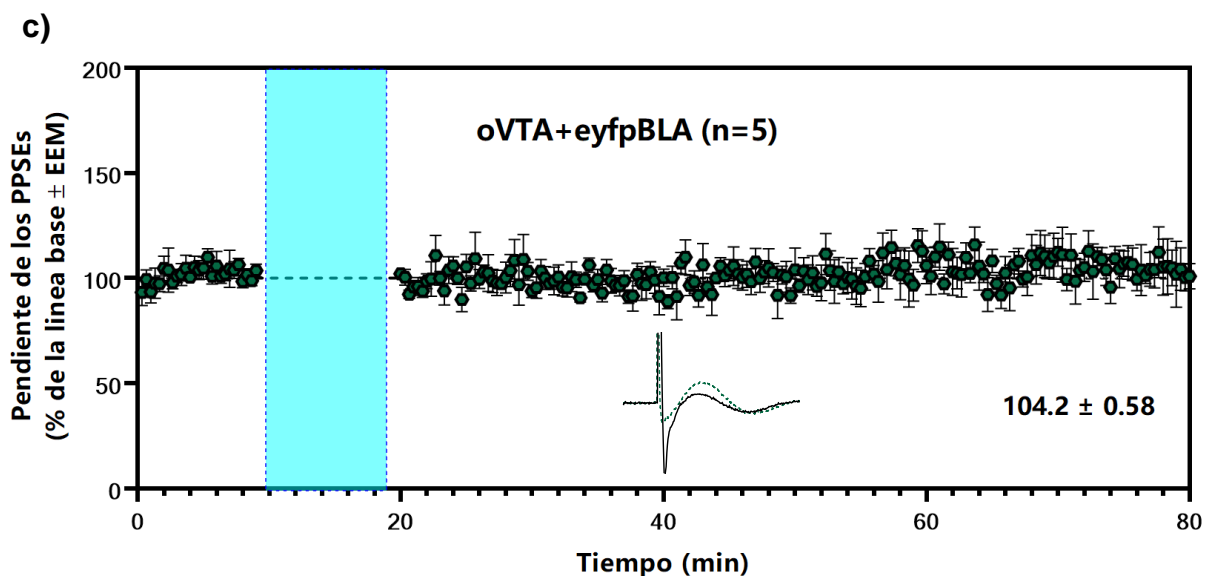
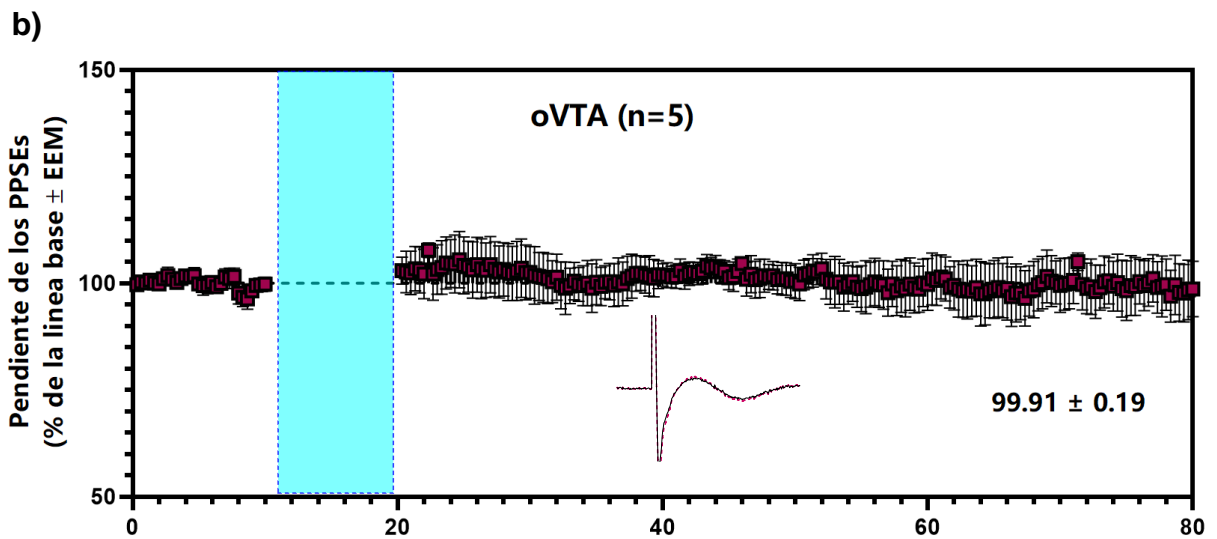
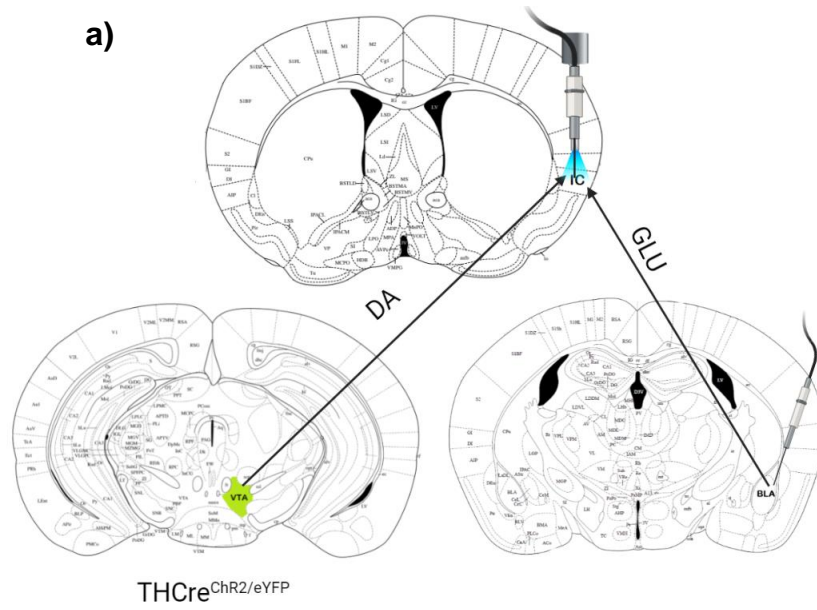


Figura 20. La estimulación optogenética solo de las fibras provenientes del VTA no induce una LTP en la IC. a) Representación esquemática de la inyección de virus en el VTA, colocación del electrodo de estimulación en el BLA y el optrodo en la IC (electrodo de registro y fibra óptica). b y c) Gráfica de la media de los porcentajes de los PPSEs antes y después del protocolo de estimulación optogenética en la IC, el sombreado azul representa el tiempo en el cual se realizó el encendido del láser. b) VTA con ChR2-eYFP. c) eYFP en VTA. Abajo de cada gráfica se muestra el trazo representativo de las señales obtenidas antes (línea sólida) y los últimos 30 min después de la estimulación (línea punteada).

4.4. Efecto de la estimulación optogenética de las fibras provenientes de la BLA en la IC.

Finalmente, para determinar si la estimulación optogenética solo de las proyecciones glutamatérgicas en la IC provenientes del BLA, inducen una LTP, se llevó a cabo la administración del constructo AAV bajo el promotor CamKII de forma unilateral en la BLA, el canal de rodopsina – 2 (ChR2) fusionado con la proteína amarillo fluorescente (eYFP) o ChR2 en la BLA y el constructo AAV reportero con la proteína eYFP en el VTA en ratones WT (Figura 21a). Se llevó a cabo el mismo protocolo de estimulación previamente descrito.

Los resultados indican que el grupo donde fueron estimuladas las fibras provenientes de BLA (oBLA) no se observan cambios en la eficiencia sináptica ($101.8 \pm 0.28 \%$) comparado con la línea basal (Figura 21b). De manera similar, se observa que en el grupo que fue administrados con el constructo viral con la proteína reportera EYFP, no se observan cambios en la eficiencia sináptica (104.2 ± 0.58) (Figura 21c). Lo que sugiere que la estimulación optogenética solo de las fibras del BLA no inducen una LTP en la IC.

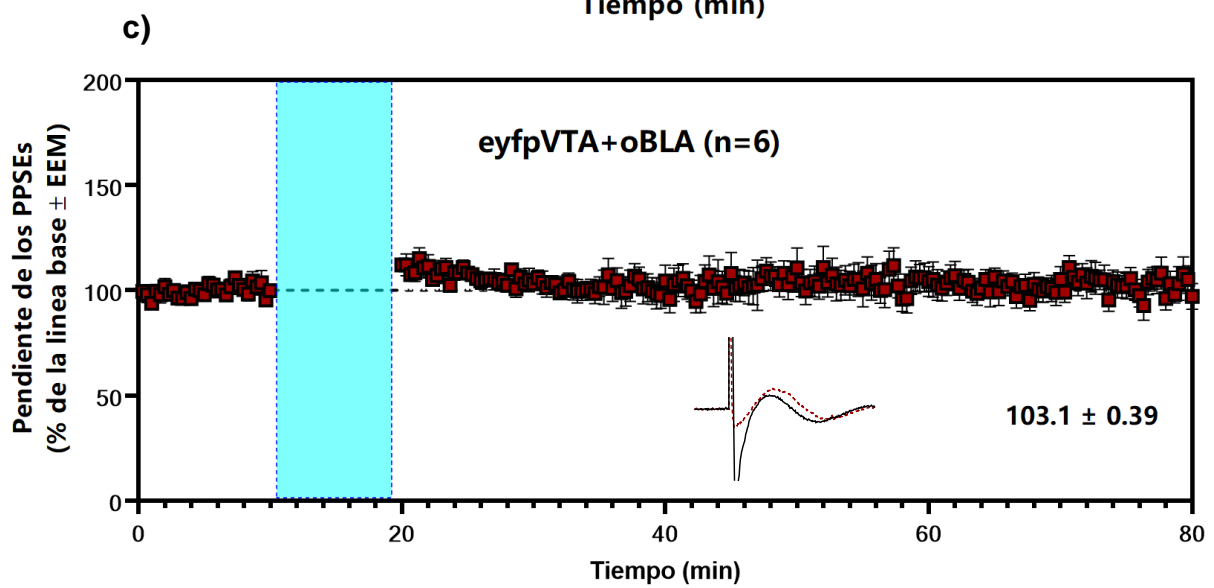
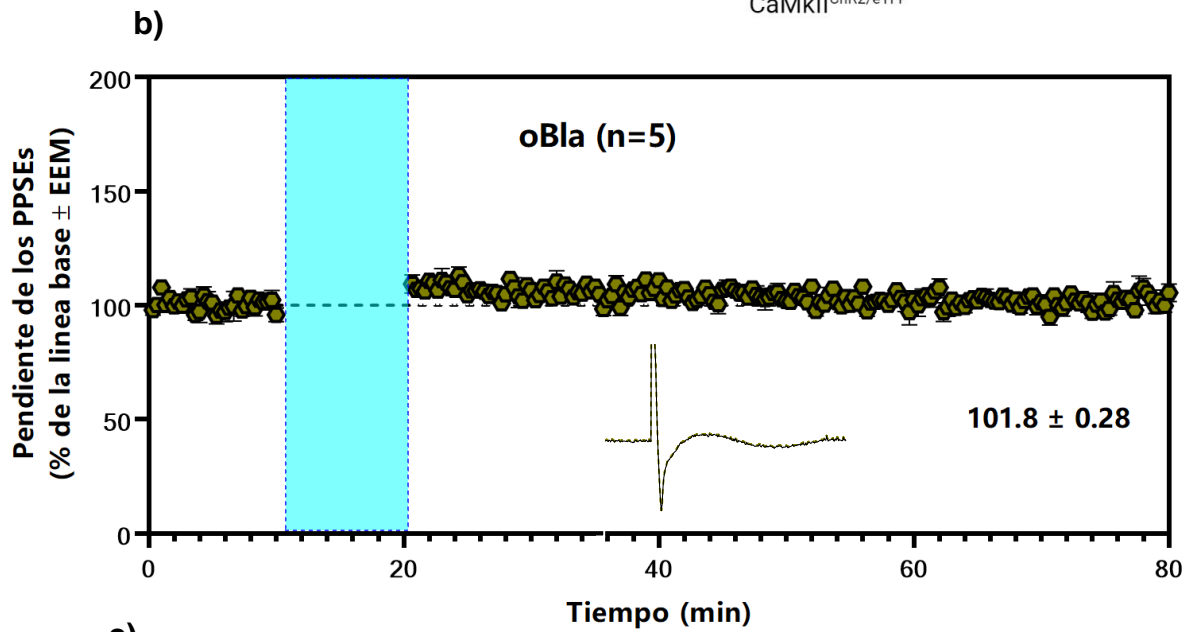
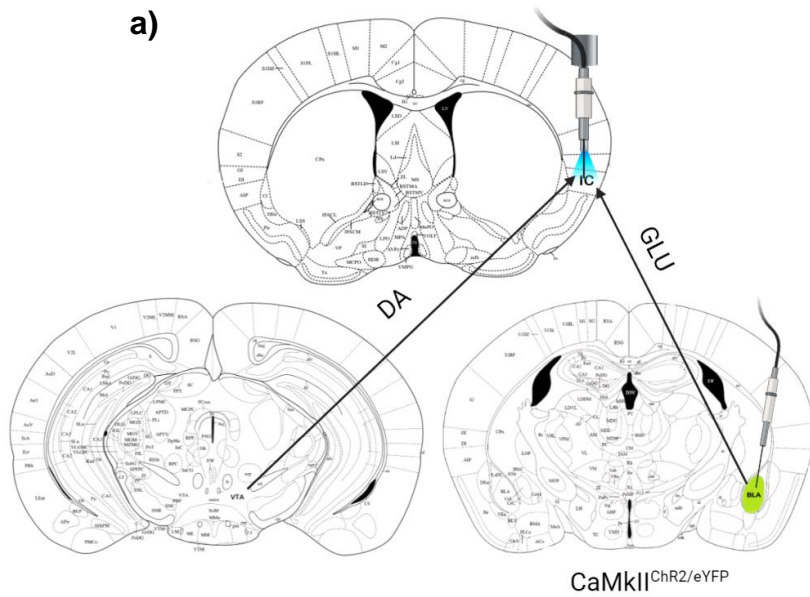
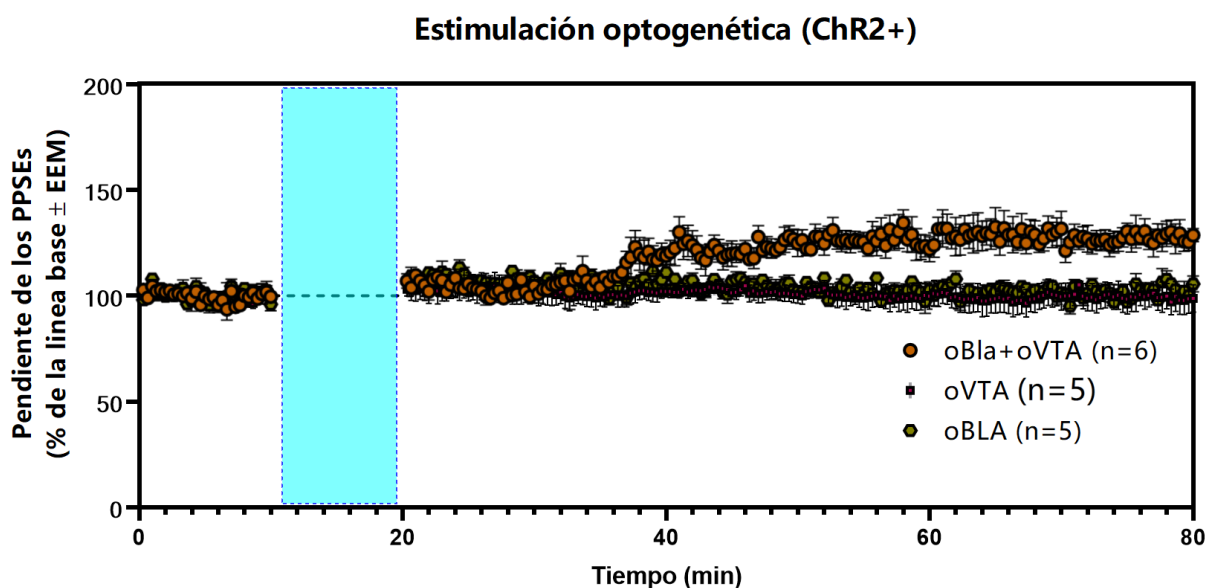


Figura 21. La estimulación optogenética de las fibras provenientes del BLA no induce una LTP en la IC. a) Representación esquemática de la inyección de virus en la BLA, colocación del electrodo de estimulación en la BLA y el optrodo en la IC (electrodo de registro y fibra óptica). b y c) Gráfica de la media de los porcentajes de los PPSEs antes y después del protocolo de estimulación optogenética en la IC, el sombreado azul representa el tiempo en el cual se realizó el encendido del láser. b) BLA con Chr2-eYFP. c) eYFP en BLA. Abajo de cada gráfica se muestra el trazo representativo de las señales obtenidas antes (línea sólida) y los últimos 30 min después de la estimulación (línea negra).

El ANOVA de medidas repetidas comparando las pendientes de los PPSEs de los últimos 30 minutos del registro después del protocolo de estimulación optogenética mostró diferencias significativas entre los grupos que fueron estimulados optogenéticamente ($F(2, 12) = 16.31; p < 0.005$) (Figura 22a). El análisis post-hoc empleando la prueba de Fisher mostró diferencias significativas entre el grupo oVTA + oBLA en comparación con los demás grupos (oVTA y oBLA) ($p < 0.0001$), mientras que los grupos que fueron infectados solo con la proteína reportera eYFP, no mostraron diferencias significativas entre sí (Figura 22b). Estos resultados nos indican que la estimulación optogenética simultánea de las fibras de VTA y el BLA inducen una LTP demorada en la CI, mientras que este efecto no es observado con la estimulación de las fibras del VTA y del BLA por separado (Figura 22c).

a)



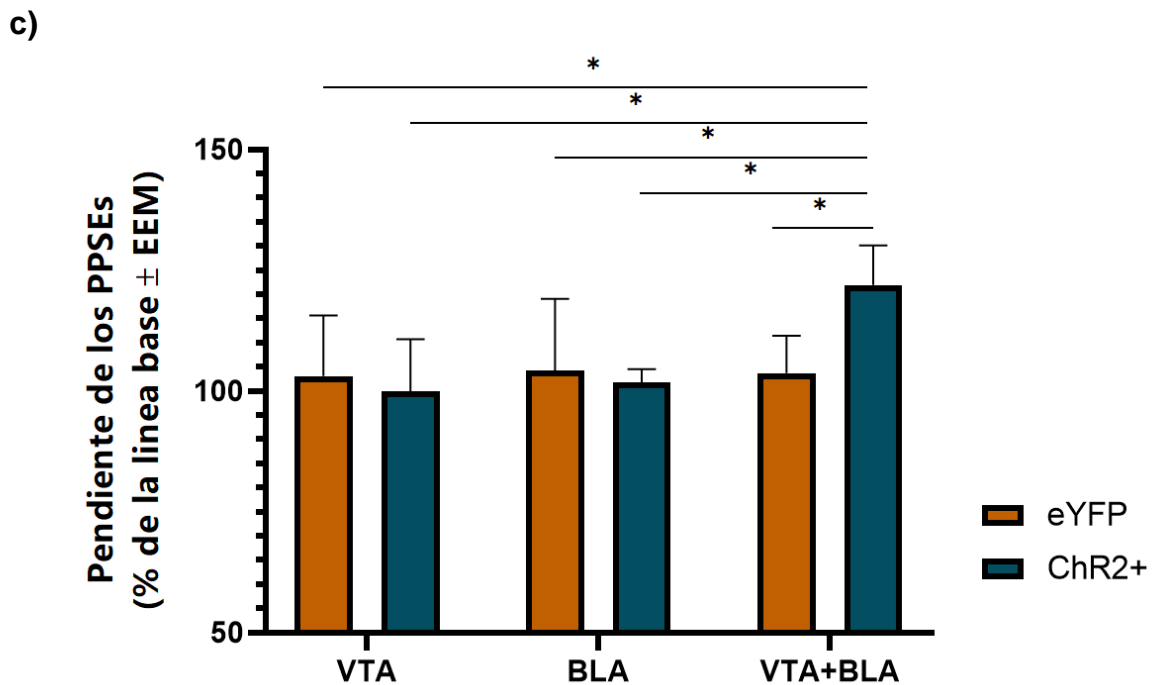
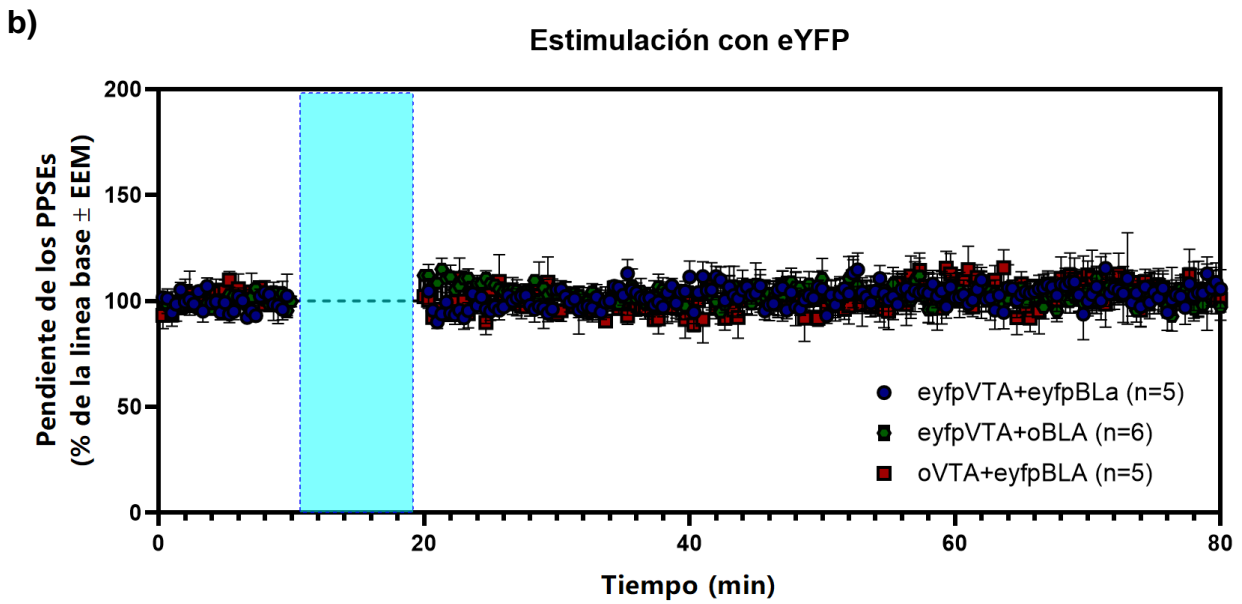


Figura 22. Efecto del protocolo de inducción de LTP optogenética en los diferentes grupos. a) Gráfica de la media de los porcentajes de los PPSEs antes y después del protocolo de estimulación optogenética en la IC en los grupos que fueron estimulados optogenéticamente (Chr2+). b) Gráfica de la media de los porcentajes de los PPSEs antes y después del protocolo de estimulación optogenética en la IC en los grupos con la proteína reportera eYFP. c) Gráfica resumen de los resultados obtenidos. Los grupos que fueron infectados con la proteína reportera eYFP no muestran inducción de LTP (Barras naranjas). De manera similar, los grupos Chr2+, correspondientes a VTA y BLA de forma separada, tampoco muestran un cambio en la eficiencia sináptica. En contraste, en el grupo que fue estimulado optogenéticamente de forma conjunta en el VTA y BLA (oVTA + oBLA), se observa

la inducción de una LTP 20 minutos después de la estimulación. $*p < 0.05$. Abreviaturas: PPSEs, potenciales postsinápticos excitatorios; EEM, error estándar de la media; VTA, área ventral tegmental; BLA, amígdala basolateral; VTA + BLA estimulación conjunta de ambas zonas; eYFP, proteína reportera verde; ChR2+, canal de rodopsina 2.

5. Discusión

Los cambios en la eficiencia de las conexiones sinápticas se han propuesto como el sustrato molecular de la memoria y el aprendizaje (Citri y Malenka, 2008; Sweatt, 2016a). La LTP, como uno de los modelos para el estudio de estos procesos, nos brinda información sobre los mecanismos implicados que inducen estos cambios (Martin et al., 2000; Nicoll y Roche, 2013). La forma convencional para inducir una LTP artificialmente es a través de aplicar trenes de estimulación eléctrica de alta frecuencia de fibras presinápticas (Bliss y Lømo, 1973), sin embargo, esta inducción presenta limitaciones como la falta de control selectivo de poblaciones neuronales y sus proyecciones (Xie, Jackson y MacDonald, 2013). El uso de la técnica optogenética para el estudio de la plasticidad sináptica, cubre estas limitaciones ya que permite tener un mayor control de la actividad de poblaciones neuronales específicas (Boyden et al., 2005). Por lo tanto, el uso de esta técnica permite examinar la interacción de poblaciones neuronales con otras poblaciones o núcleos que podrían estar participando en la inducción de cambios plásticos asociados al aprendizaje y la memoria.

Los resultados obtenidos en esta investigación indican que la estimulación optogenética simultánea a una frecuencia de 20Hz de las fibras provenientes del VTA y la BLA inducen una LTP de inicio lento en la IC. Por otra parte, los datos muestran que la estimulación optogenética de las fibras provenientes de la BLA no inducen una LTP en la IC. Finalmente, la estimulación de las fibras que provienen de VTA, no inducen LTP en la IC. Estos resultados en conjunto muestran que la interacción de la neuromodulación catecolaminérgica a través de la estimulación del VTA y la neuromodulación glutamatérgica proveniente de la BLA, inducen cambios plásticos en la IC. Además, estos resultados sugieren que la inducción de plasticidad sináptica en la IC mediante la coactivación del VTA y la BLA podría estar implicada en la formación y mantenimiento de memorias adictivas. A continuación, se discutirán los hallazgos obtenidos en esta investigación.

5.1. La estimulación de las fibras provenientes del VTA, así como las fibras del BLA de forma individual no inducen LTP en la IC.

La estimulación optogenética del VTA nos permite tener un control espacial y temporal más preciso de las neuronas catecolaminérgicas (Adamantidis et al., 2011). Por lo tanto, con esta herramienta, es posible estudiar la interacción del VTA con otros circuitos que podrían estar implicados en el mantenimiento y la extinción de memorias adictivas. Reportes indican que mediante la fotoestimulación fásica de potenciales de acción en neuronas dopaminérgicas en el VTA es posible generar un condicionamiento de una memoria contextual como el protocolo de condicionamiento de preferencia de lugar (Tsai et al., 2009). Asimismo, ha sido reportado que la activación de receptores dopaminérgicos D1 no induce cambios plásticos por sí mismos, pero la activación de dichos receptores modifica el umbral para inducir LTP (Mockett et al., 2007). Estos estudios sugieren que el VTA juega un papel como modulador en la adquisición de memorias contextuales.

En un estudio previo de nuestro grupo de investigación, se observó un incremento de la tasa de disparo de neuronas TH+ del VTA en la banda de frecuencias de 4Hz hasta 20Hz en respuesta a la fotoestimulación optogenética y, en contraste, la tasa de disparo en neuronas del IC disminuyó en respuesta a estimulación de neuronas TH+ del VTA (Gil-Lievana et al., 2020). Adicional a este experimento, se reportó que la sola estimulación optogenética de las fibras de la IC provenientes del VTA no produce un CPP, mientras que la sola administración de cocaína y administrando cocaína en conjunto con la estimulación optogenética si genera preferencia (Gil-Lievana et al., 2020) . Estos experimentos sugieren que si bien existe una conexión funcional entre estas zonas y son necesarias en la formación de la memoria adictiva hay otras estructuras cerebrales involucradas. Además, son congruentes con nuestros datos, donde observamos que la fotoestimulación de las fibras TH+ en la IC provenientes del VTA no inducen una LTP.

En varios estudios ha sido reportada la conexión funcional entre en BLA y la IC y su participación en la formación de memorias apetitivas y aversivas (Escobar y Bermúdez-Rattoni, 2000; Rodríguez-Durán et al., 2016). También se ha reportado que la estimulación eléctrica de alta frecuencia en la BLA induce una LTP en la IC que puede ser bloqueada por la administración antagonistas de NMDA (Escobar y Bermúdez-Rattoni, 2000). No obstante, hay pocos reportes donde la inducción de LTP

se realice optogenéticamente mediante la aplicación de trenes de alta frecuencia. En un estudio, se reportó que la estimulación optogenética de alta frecuencia induce una LTP optogenética (Bulin et al., 2020). Para ello, se utilizó una variante del receptor de rodopsina (ChETA) en la cual la cinética del canal es mucho más rápida, lo que permite que las altas frecuencias sean más efectiva para inducir una LTP optogenética (Gunaydin et al., 2010). El protocolo de estimulación utilizado en Bulin et al, 2020, es de 10 pulsos, 250 Hz, 10s por 1.5 minutos, lo que indica una frecuencia de estimulación alta en comparación con el protocolo de estimulación utilizado en este proyecto que es de 100 pulsos, 20Hz, 10s por 10 minutos. El uso de una frecuencia más baja (20 Hz), nos permite ajustarnos a un modelo más cercano al funcionamiento fisiológico del sistema evitando la sobresaturación. En este sentido, nuestros resultados sugieren que la activación optogenética de fibras provenientes del VTA y el BLA, de manera individual son insuficientes para la inducción de la LTP.

5.2. Inducción de una LTP demorada en la IC por la estimulación optogenética simultánea del VTA y la BLA.

La activación optogenética simultánea de las fibras provenientes del BLA y las fibras provenientes del VTA inducen una LTP en la IC. En los estudios convencionales para inducir una LTP se aplican trenes de estimulación de alta frecuencia (Bliss y Gardner-Medwin, 1973; Volianskis et al., 2015). Cabe destacar que, los reportes donde se ha inducido optogenéticamente la LTP in vivo son limitados. En un estudio, se ha reportado que el condicionamiento al miedo puede ser inactivado y reactivado mediante la inducción de LTD y LTP respectivamente en la amígdala lateral (Nabavi et al., 2014). No obstante, si bien este estudio indica que es posible la inducción de LTP por medio de estimulación optogenética monosináptica, se hace uso de una variante de ChR2, oChIEF, canal que es activado por frecuencias de 50 – 100Hz (Gunaydin et al., 2010). Por otra parte, se ha reportado que a través de la estimulación presináptica eléctrica en conjunto con la despolarización postsináptica optogenética puede inducirse una LTP (Ma et al., 2018). Este reporte, marca un antecedente a nuestro proyecto por el uso de un modelo in vivo que permite la estimulación de dos vías de forma simultánea. En este trabajo proponemos un protocolo experimental que nos permite estimular con optogenética las fibras del VTA en conjunto con la estimulación de las fibras del BLA en la IC para inducir una LTP in vivo.

La IC, específicamente en la zona agranular, contiene una alta densidad de fibras dopaminérgicas (Kutlu et al., 2013; Pushparaj y Le Foll, 2015). Por otro lado, la zona agranular de la IC, también recibe fibras provenientes de la BLA (Gerfen y Clavier, 1979; Shi y Cassell, 1998; Uematsu et al., 2015). La fotoactivación de las neuronas TH+ induce la liberación de dopamina en la IC (Gil-Lievana et al., 2020). Adicionalmente, la modulación dopaminérgica está involucrada en la inducción de plasticidad estructural en sinapsis glutamatérgicas en diferentes zonas de la corteza cerebral (Yagishita et al., 2014). Con el fin de estudiar la inducción de cambios plásticos en la IC, utilizamos vectores virales con promotores específicos para la estimulación de las fibras provenientes del VTA y la BLA, zonas involucradas en el mantenimiento de memorias adictivas (Argilli et al., 2008; Bachtell et al., 2005; Lammel et al., 2012; See, 2002). Experimentos previos donde fueron utilizadas tareas conductuales dependientes de la IC, sugieren que la liberación de neurotransmisores como las catecolaminas y glutamato son relevantes en el mantenimiento de respuestas condicionadas (Osorio-Gómez et al., 2016). Por otro lado, el bloqueo de receptores NMDA en la IC, acelera el proceso de extinción después de un protocolo de condicionamiento (Gil-Lievana et al., 2020). Estos resultados sugieren que la actividad conjunta de la modulación dopaminérgica y la activación de los receptores NMDA participan en el mantenimiento de memorias adictivas.

La estimulación optogenética de las fibras dopaminérgicas provenientes del VTA en conjunto con la estimulación eléctrica de las neuronas glutamatérgicas del cuerpo estriado producen un alargamiento de espinas dendríticas en una ventana de tiempo de menos de 2s entre las dos estimulaciones (Yagishita et al., 2014). De igual modo, la actividad dopaminérgica en conjunto con la actividad glutamatérgica facilita la inducción de una LTP en un modelo in vivo (Gurden et al., 1999) e in vitro (Otani et al., 2015). Estos hallazgos dan soporte a nuestros resultados, donde proponemos que la inducción optogenética de la LTP en la IC requiere de la neuromodulación dopaminérgica de las fibras provenientes del VTA

De manera interesante, en este proyecto, encontramos que la estimulación optogenética simultánea de las fibras provenientes de VTA y BLA, inducen una LTP a los 20 minutos después de haber aplicado el protocolo de estimulación. Proponemos que este efecto de inicio lento de la LTP podría deberse los tiempos de inicio de los mecanismos moleculares de los receptores dopaminérgicos tipo D1-D5. La inducción

de plasticidad sináptica en la corteza es dependiente de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), de modo que el bloqueo de estos receptores o la ausencia de neuromoduladores bloquean la inducción de fenómenos como la LTP (He et al., 2015; Huang et al., 2014). Por ejemplo, diversos estudios han reportado que la modulación dopaminérgica es dependiente la activación de los receptores transmembranales denominados receptores metabotrópicos D1-D5, que solo se encuentran en neuronas postsinápticas dopaminérgicas y gabaérgicas (Otani et al., 2015). Estos receptores desencadenan una sucesión de reacciones bioquímicas que son expresados minutos después de la activación de la proteína G estimuladora (Gs) (Katritch et al., 2012). La activación de la proteína GS activa la adenilato ciclasa para producir AMPc que a su vez activa la cascada de señalización intracelular dependiente de la proteína quinasa A (PKA) (Greengard, 2001). La activación de los receptores D1/D5 no produce despolarización de las membranas neuronales, pero pueden influir en las propiedades electrofisiológicas de otros receptores como en el caso de los receptores ionotrópicos glutamatérgicos NMDA (Seamans y Yang, 2004).

Diversos estudios han reportado que la activación de receptores D1 incrementan las respuestas mediadas por NMDA en el hipocampo (Huang y Kandel, 1995) y en neuronas corticales como en la mPFC (Jeremy K. Seamans y Yang, 2004). Estudios in vitro reportan que la modulación dopaminérgica y la activación de los receptores NMDA en el hipocampo producen una inducción demorada de la LTP y con una duración prologada (> de 3 horas). Este efecto fue reportado por Huang y Kandel (1995) y fue denominada como “potenciación tardía”. Nuestros datos sugieren que la dinámica de la curva de inducción de la LTP que obtuvimos es congruente con la activación lenta de los receptores tipo D1-D5 en la IC. Entre nuestras perspectivas, se propone la inhibición de los receptores D1 para corroborar su participación en la inducción de la LTP. Adicionalmente, creemos que la inducción de una LTP de inicio retardado requiere de la activación en conjunto de la vía glutamatérgica y neuromoduladores como la dopamina dentro de ventanas de tiempo específicas que podría ser explicado por los mecanismos de otros modelos como la plasticidad dependiente de la sincronización de los potenciales de acción (STDP).

5.3. La modulación catecolaminérgica de la STDP como un mecanismo de inducción de oLTP.

La plasticidad sináptica de fibras glutamatérgicas es susceptible a la modulación por neurotransmisores como las catecolaminas (Brzosko et al., 2019). Por ejemplo, se ha reportado que las catecolaminas pueden modular la inducción de la LTP inducida con diferentes protocolos experimentales (Pignatelli y Bonci, 2015a). La LTP puede ser inducida por la plasticidad dependiente de la sincronización de las espigas (STDP por sus siglas en inglés: Spike-timing-dependent synaptic plasticity), una técnica experimental que se basa en la sincronización precisa entre la activación presináptica y postsináptica (Bi y Poo, 1998; Pawlak et al., 2010; Song et al., 2000). Si la activación repetitiva de una célula presináptica es inmediatamente antes de la activación en una célula postsináptica, se inducirá potenciación a largo plazo dependiente del tiempo (t-LTP) (Bi y Poo, 1998). Por otro lado, la activación repetida de una célula presináptica inmediatamente después de una célula postsináptica conduce a una depresión a largo plazo dependiente del tiempo (t-LTD) (Bi y Poo, 1998). Debido a esto, la STDP es propuesto como un modelo relevante en la inducción de cambios plásticos en situaciones fisiológicas naturales (Froemke y Dan, 2002; Schulz et al., 2010; Yao y Dan, 2001).

La evidencia actual sugiere que la neuromodulación modifica el umbral de inducción de cambios plásticos para la sincronización de la activación presináptica y postsináptica para inducir STDP (Pawlak et al., 2010; Andersen et al., 2017). Se ha reportado que la activación de los receptores de dopamina tipo 1 (D1Rs) es necesaria para inducir la t-LTP en sinapsis colateral-CA1 de Schaffer en cortes de hipocampo de ratas jóvenes (Edelmann y Lessmann, 2011). La evidencia en cultivos de células de hipocampo sugiere que el efecto de la dopamina en la t-LTP puede deberse a una reducción en el umbral para la inducción de plasticidad, ya que la activación de D1Rs redujo el número de disparos necesarios para inducir la LTP (Zhang et al., 2009). La DA también amplía considerablemente la ventana de tiempo para detectar coincidencias en las células pre y postsinápticas, facilitando la inducción de t-LTP. Así, la activación de D1R en zonas de la corteza prefrontal (Ruan et al., 2014; Xu y Yao, 2010) como en cultivos de hipocampo (Zhang et al., 2009) permite la inducción de t-LTP a intervalos de tiempo de picos sustancialmente más largos. La ventana temporal para la inducción de t-LTP depende de procesos como las corrientes postsinápticas

de Ca^{2+} a través de los canales NMDA y las cascadas de señalización por Ca^{2+} (Caporale y Dan, 2008). La activación de los receptores D1 inicia la cascada de señalización AMPc-PKA, que puede modular la conductancia de los NMDA, y por lo tanto la entrada de Ca^{2+} lo que facilita la inducción de la LTP. Por lo tanto, es posible que el incremento catecolaminérgico module las ventanas temporales para la introducción de calcio al interior de las neuronas de la IC, lo cual promueve la inducción de la LTP en nuestro modelo. Nuestros datos muestran que la modulación dopaminérgica no causa por sí misma plasticidad, pero si modula a los receptores glutamatérgicos para promover la inducción de LTP, sin embargo, quedan por ser determinados los mecanismos implicados.

5.4. Posibles mecanismos moleculares involucrados en la inducción de oLTP en la IC por la estimulación de VTA-BLA.

Estudios previos indican que hay dos fases en los mecanismos intracelulares que están implicados en la interacción de la vía dopaminérgica y glutamatérgica (Seamans y Yang, 2004). En la primera fase que comprende el orden de segundos a minutos, la activación de canales glutamatérgicos como los NMDA son regulados por la vía de activación de receptores dopaminérgicos D1, que estimulan la formación de AMPc sintetizada por adenilato ciclasa, que luego activa la cascada de señalización intracelular dependiente de la proteína quinasa A (PKA) para modular la plasticidad sináptica (Greengard, 2001). En estudios realizados en el hipocampo, se ha reportado que la aplicación de antagonistas dopaminérgicos o inhibidores de PKA, no permiten el mantenimiento de la L-LTP en CA1 (Impey et al., 1998). Adicionalmente, un estudio realizado en ratones knock-out del receptor D1, se reporta que no expresan la fase tardía de potenciación a largo plazo en las sinapsis de CA1 (Matthies et al., 1997). En conjunto, estos hallazgos sugieren que la estimulación del receptor D1 activa la vía PKA y conduce a la transcripción de genes y la síntesis de proteínas que son esenciales para el mantenimiento de cambios a largo plazo en la plasticidad sináptica dependiente de la actividad en el hipocampo.

En la segunda fase del orden de minutos a horas después de la estimulación de los receptores D1, la entrada de Ca^{2+} a través de los receptores NMDA y los canales de Ca^{2+} dependientes del voltaje, activan cinasas dependientes de Ca^{2+} (Lamprecht y LeDoux, 2004) como las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK). Esto se ve respaldado por el estudio de Xue et al 2015 donde reporta que la administración

de agonistas de receptores D1, incrementa los niveles de ERK fosforilada de forma selectiva en zonas como la PFC (Xue et al., 2015). Estas evidencias sugieren que la inducción de la LTP optogenética en que hemos observado con nuestro protocolo podría depender de la activación de cinasas dependientes de la entrada de Ca²⁺ a través de los receptores NMDA y la facilitación por la cascada de señalización por los receptores D1.

Finalmente, nuestros resultados sugieren que la modulación dopaminérgica que proviene de las fibras del VTA y la estimulación glutamatérgica de las fibras provenientes del BLA, participan en la inducción de una LTP de inicio demorado en la IC inducida por estimulación optogenética. Por lo tanto, sugerimos que el incremento de las catecolaminas está modulando la temporalidad de la activación pre y postsináptica.

5.5. Implicaciones del modelo en el estudio de las memorias adictivas.

Con base en los resultados obtenidos en la presente investigación, planteamos un modelo experimental que nos permite inducir plasticidad sináptica in vivo en la CI mediante la estimulación optogenética simultánea de las fibras del VTA y del BLA. Se ha descrito anteriormente que la señalización glutamatérgica proveniente del BLA en la IC constituye un mecanismo en el mantenimiento de memorias asociadas al contexto. Adicionalmente, la IC recibe aferencias del VTA, lo que sugiere que hay una conexión funcional entre estas áreas (Gil-Lievana et al., 2020).

Durante los últimos años, se ha estudiado a la adicción como un tipo de aprendizaje no adaptativo que usurpa los mecanismos neuronales que normalmente subyacen a procesos de aprendizaje y memoria (Kauer y Malenka, 2007; Lüscher y Malenka, 2011). La administración de una sustancia de abuso aumenta la neurotransmisión dopaminérgica en el sistema mesocórtico límbico y el consumo crónico, causa alteraciones en la fuerza de las conexiones sinápticas en estructuras implicadas en el circuito de recompensa mediado por la neurotransmisión glutamatérgica (Cooper et al., 2017; Lüscher y Malenka, 2011; Pignatelli y Bonci, 2015). En nuestro modelo, la interacción entre la neurotransmisión dopaminérgica y glutamatérgica permite inducir cambios plásticos en la IC, lo que sugiere que el VTA y la BLA participan en la integración de la información visceral y contextual relacionada con el mantenimiento de las memorias asociadas con la adicción.

En síntesis, indujimos una LTP *in vivo* mediante la estimulación optogenética simultánea de dos vías, con frecuencias más bajas que las utilizadas en la electrofisiología convencional. Utilizando este enfoque, nuestro modelo se acerca más a las condiciones fisiológicas relacionadas con la formación y mantenimiento de memorias adictivas, lo que nos permitirá obtener más información sobre los mecanismos implicados en la inducción de plasticidad en estos circuitos. Esta aproximación, nos permite comprender la complejidad de los mecanismos plásticos asociados con las adicciones y su relación con los procesos de memoria y aprendizaje. Entender sus implicaciones nos permite, en conjunto con otros estudios de diferentes disciplinas científicas, proponer enfoques integrales para el tratamiento de las adicciones.

6. Conclusiones

La corteza insular (IC) y el núcleo basolateral de la amígdala (BLA) comparten importantes conexiones funcionales y anatómicas que están involucradas de manera importante en el mantenimiento de memorias adictivas. Además, ambas regiones comparten interconexiones con el área ventral tegmental (VTA) lo que indica que la vía dopaminérgica tiene un papel relevante en la inducción de la LTP inducida por optogenética en la IC (Figura 23).

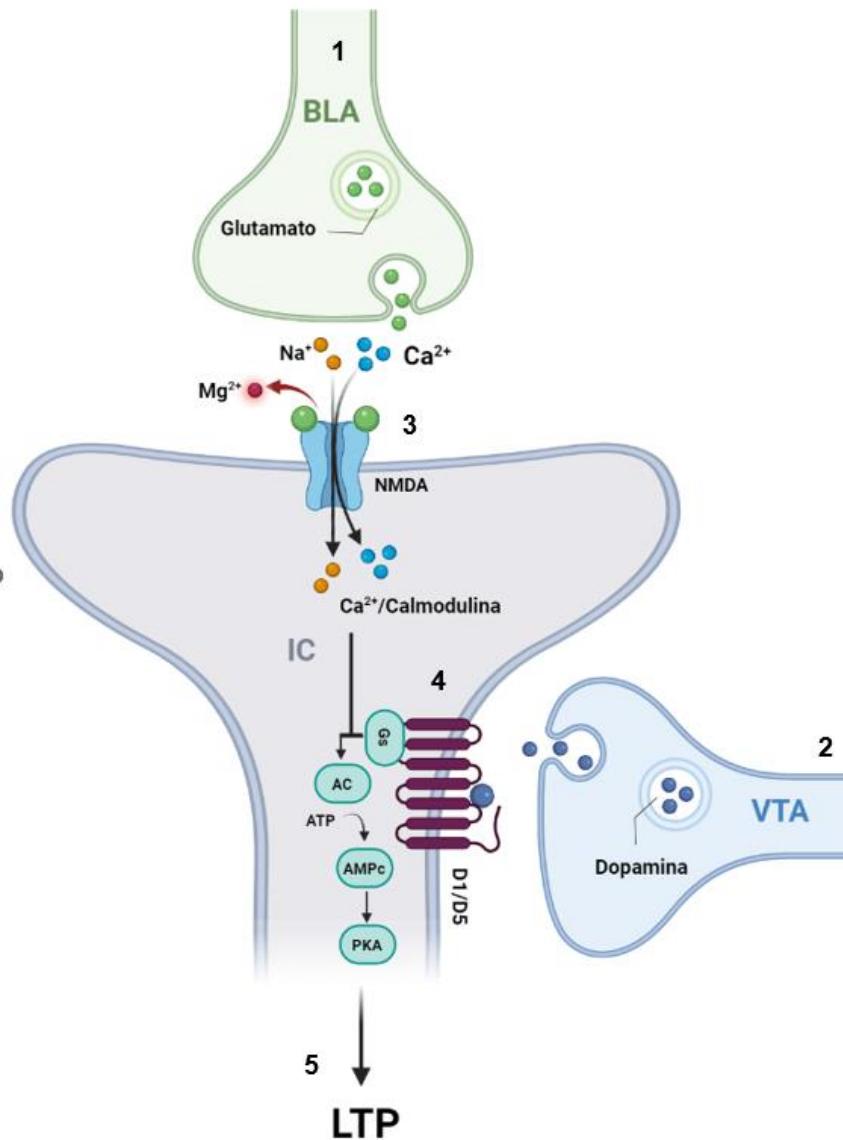


Figura 23. Representación de la inducción de LTP en la IC por la estimulación optogenética simultánea de las fibras del VTA y BLA. 1) Estimulación de las fibras provenientes del BLA libera glutamato en la IC. 2) Estimulación de las fibras provenientes del VTA libera dopamina en la IC. 3) Entrada de iones de Ca^{2+} a través de receptores NMDA inicia señalización Ca^{2+} /Calmodulina. 4) La activación de receptores dopaminérgicos D1/D5 inicia la vía de señalización cAMP-PKA. 5) Detección de una LTP tardía (20 minutos después de la estimulación optogenética simultánea).

En este proyecto, encontramos que la modulación dopaminérgica de las fibras provenientes del VTA en conjunto con la activación de las fibras glutamatérgicas del BLA son fundamentales para la inducción de la LTP en la IC. Nuestro modelo experimental representa una evidencia *in vivo* de la modulación dopaminérgica en la

inducción de la LTP, destacando así su participación en la plasticidad sináptica y en la formación de la memoria.

7. Perspectivas

Los resultados obtenidos en la presente investigación nos llevan a proponer algunas consideraciones para investigaciones próximas con relación al mantenimiento de memorias adictivas:

- a) Incrementar la n de los experimentos para dar mayor robustez a nuestros hallazgos.
- b) Medir los cambios en los niveles extracelulares de neurotransmisores liberados durante la estimulación conjunta de las fibras del VTA y la BLA en la IC.
- c) Determinar los mecanismos moleculares implicados en la inducción de la LTP en la IC por la estimulación conjunta de las fibras del VTA y la BLA en la IC en conjunto con manipulaciones farmacológicas.
- d) Evaluar los cambios conductuales inducidos por la estimulación optogenética conjunta de las fibras del VTA y la BLA en la IC en un paradigma para evaluar la formación y mantenimiento de memorias adictivas en tiempo real.

8. Referencias

- Abraham, W. C., Logan, B., Greenwood, J. M., & Dragunow, M. (2002). Induction and experience-dependent consolidation of stable long-term potentiation lasting months in the Hippocampus. *Journal of Neuroscience*, *22*(21), 9626–9634. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-21-09626.2002>
- Adamantidis, A. R., Tsai, H. C., Boutrel, B., Zhang, F., Stuber, G. D., Budygin, E. A., Touriño, C., Bonci, A., Deisseroth, K., & de Lecea, L. (2011). Optogenetic interrogation of dopaminergic modulation of the multiple phases of reward-seeking behavior. *Journal of Neuroscience*, *31*(30), 10829–10835. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2246-11.2011>
- Akins, C. K., Eaton, S. E., & Bolin, B. L. (2017). Conditioned Place Preference. In *Encyclopedia of Animal Cognition and Behavior* (pp. 1–8). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-47829-6_1303-1
- Ambroggi, F., Ishikawa, A., Fields, H. L., & Nicola, S. M. (2008). Basolateral Amygdala Neurons Facilitate Reward-Seeking Behavior by Exciting Nucleus Accumbens Neurons. *Neuron*, *59*(4), 648–661. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.07.004>
- Andersen, N., Krauth, N., & Nabavi, S. (2017). Hebbian plasticity in vivo: relevance and induction. *Current Opinion in Neurobiology*, *45*, 188–192. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.06.001>
- Argilli, E., Sibley, D. R., Malenka, R. C., England, P. M., & Bonci, A. (2008). Mechanism and time course of cocaine-induced long-term potentiation in the ventral tegmental area. *Journal of Neuroscience*, *28*(37), 9092–9100. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1001-08.2008>
- Bachtell, R. K., Whisler, K., Karanian, D., & Self, D. W. (2005). Effects of intranucleus accumbens shell administration of dopamine agonists and antagonists on cocaine-taking and cocaine-seeking behaviors in the rat. *Psychopharmacology*, *183*(1), 41–53. <https://doi.org/10.1007/s00213-005-0133-1>
- Bailey, C. H., Giustetto, M., Huang, Y. Y., Hawkins, R. D., & Kandel, E. R. (2000). Is Heterosynaptic modulation essential for stabilizing hebbian plasticity and memory. *Nature Reviews Neuroscience*, *1*(1), 11–20. <https://doi.org/10.1038/35036191>
- Baltaci, S. B., Mogulkoc, R., & Baltaci, A. K. (2018). Molecular Mechanisms of Early and Late LTP. *Neurochemical Research* *2018* *44*:2, *44*(2), 281–296.

<https://doi.org/10.1007/S11064-018-2695-4>

Baltaci, S. B., Mogulkoc, R., & Baltaci, A. K. (2019). Molecular Mechanisms of Early and Late LTP. *Neurochemical Research*, 44(2), 281–296. <https://doi.org/10.1007/S11064-018-2695-4>

Barnett, S. C., Perry, B. A. L., Dalrymple-Alford, J. C., & Parr-Brownlie, L. C. (2018). Optogenetic stimulation: Understanding memory and treating deficits. *Hippocampus*, 28(7), 457–470. <https://doi.org/10.1002/hipo.22960>

Bear, M., Connors, B., & Paradiso, M. A. (2020). *Neuroscience: Exploring the brain*. Jones & Bartlett Learning, LLC.

Berke, J. D. (2018). What does dopamine mean? *Nature Neuroscience*, 21(6), 787–793. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0152-y>

Bermudez-Rattoni, F. (2014). The forgotten insular cortex: Its role on recognition memory formation. In *Neurobiology of Learning and Memory* (Vol. 109, pp. 207–216). Neurobiol Learn Mem. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.01.001>

Bi, G. Q., & Poo, M. M. (1998). Synaptic modifications in cultured hippocampal neurons: Dependence on spike timing, synaptic strength, and postsynaptic cell type. *Journal of Neuroscience*, 18(24), 10464–10472. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.18-24-10464.1998>

Bliss, T. V. P., Collingridge, G. L., & Morris, R. G. M. (2014). Synaptic plasticity in health and disease: Introduction and overview. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1633). <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0129>

Bliss, T. V. P., & Gardner-Medwin, A. R. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology*, 232(2), 357–374. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1973.sp010274>

Bliss, T. V. P., & Lømo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology*, 232(2), 331–356. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1973.sp010273>

Boyden, E. S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., & Deisseroth, K. (2005). Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nature Neuroscience*, 8(9), 1263–1268. <https://doi.org/10.1038/nn1525>

Brzosko, Z., Mierau, S. B., & Paulsen, O. (2019). Neuromodulation of Spike-Timing-

- Dependent Plasticity: Past, Present, and Future. *Neuron*, 103(4), 563–581.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.05.041>
- Bulin, S. E., Hohl, K. M., Paredes, D., Silva, J. D., & Morilak, D. A. (2020). Bidirectional optogenetically-induced plasticity of evoked responses in the rat medial prefrontal cortex can impair or enhance cognitive set-shifting. *ENeuro*, 7(1), 1–13.
<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0363-19.2019>
- Caporale, N., & Dan, Y. (2008). Spike timing-dependent plasticity: A Hebbian learning rule. In *Annual Review of Neuroscience* (Vol. 31, pp. 25–46).
<https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.31.060407.125639>
- Castellano, C., Cestari, V., Cabib, S., & Puglisi-Allegra, S. (1991). Post-training dopamine receptor agonists and antagonists affect memory storage in mice irrespective of their selectivity for D1 or D2 receptors. *Behavioral and Neural Biology*, 56(3), 283–291.
[https://doi.org/10.1016/0163-1047\(91\)90439-W](https://doi.org/10.1016/0163-1047(91)90439-W)
- Chen, Y. H., Keiser, M. S., & Davidson, B. L. (2018). Viral Vectors for Gene Transfer. *Current Protocols in Mouse Biology*, 8(4), e58. <https://doi.org/10.1002/cpmo.58>
- Citri, A., & Malenka, R. C. (2008). Synaptic Plasticity: Multiple Forms, Functions, and Mechanisms. *Neuropsychopharmacology Reviews*, 33, 18–41.
<https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301559>
- Cohen, Y., Avramoav, S., Barkai, E., & Maroun, M. (2011). Olfactory learning-induced enhancement of the predisposition for LTP induction. *Learning and Memory*, 18(9), 594–597. <https://doi.org/10.1101/lm.2231911>
- Contreras, M., Billeke, P., Vicencio, S., Madrid, C., Perdomo, G., González, M., & Torrealba, F. (2012). A role for the insular cortex in long-term memory for context-evoked drug craving in rats. In *Neuropsychopharmacology* (Vol. 37, Issue 9, pp. 2101–2108). Neuropsychopharmacology. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.59>
- Cooke, S. F., & Bear, M. F. (2010). Visual experience induces long-term potentiation in the primary visual cortex. *Journal of Neuroscience*, 30(48), 16304–16313.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4333-10.2010>
- Cooper, S., Robison, A. J., & Mazei-Robison, M. S. (2017). Reward Circuitry in Addiction. In *Neurotherapeutics* (Vol. 14, Issue 3, pp. 687–697). Springer New York LLC.
<https://doi.org/10.1007/s13311-017-0525-z>
- Domjan, M. (2007). *Principios de aprendizaje y conducta*.
<https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=RsP0BDhRjwgC&oi=fnd&pg=PR2&dq=d>

omjan+principios+de+aprendizaje+y+conducta&ots=SU4n5ZzO9W&sig=5sY3rBzHk-dj8VklMy0QVQbKIJI

- Droutman, V., Read, S. J., & Bechara, A. (2015). Revisiting the role of the insula in addiction. In *Trends in Cognitive Sciences* (Vol. 19, Issue 7, pp. 414–420). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2015.05.005>
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)02134-4](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)02134-4)
- F. Ali, S., S. Onaivi, E., R. Dodd, P., L. Cadet, J., Schenk, S., J. Kuhar, M., & F. Koob, G. (2011). Understanding the Global Problem of Drug Addiction is a Challenge for IDARS Scientists. *Current Neuropharmacology*, *9*(1), 2–7. <https://doi.org/10.2174/157015911795017245>
- Feldman, D. E. (2009). Synaptic mechanisms for plasticity in neocortex. In *Annual Review of Neuroscience* (Vol. 32, pp. 33–55). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135516>
- Franklin, K., & Paxinos, G. (2008). *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=SUV.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=005184>
- Frey, U., Huang, Y. Y., & Kandel, E. R. (1993). Effects of cAMP simulate a late stage of LTP in hippocampal CA1 neurons. *Science*, *260*(5114), 1661–1664. <https://doi.org/10.1126/science.8389057>
- Froemke, R. C., & Dan, Y. (2002). Spike-timing-dependent synaptic modification induced by natural spike trains. *Nature*, *416*(6879), 433–438. <https://doi.org/10.1038/416433a>
- Fuller, R. W. (1983). The brain's three catecholamines. In *Trends in Pharmacological Sciences* (Vol. 4, Issue C, pp. 394–397). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(83\)90460-1](https://doi.org/10.1016/0165-6147(83)90460-1)
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(79\)80012-X](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(79)80012-X)
- Gil-Lievana, E., Balderas, I., Moreno-Castilla, P., Luis-Islas, J., McDevitt, R. A., Tecuapetla, F., Gutierrez, R., Bonci, A., & Bermúdez-Rattoni, F. (2020). Glutamatergic basolateral amygdala to anterior insular cortex circuitry maintains rewarding contextual memory.

Communications Biology, 3(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0862-z>

Glasgow, S. D., McPhedrain, R., Madranges, J. F., Kennedy, T. E., & Ruthazer, E. S. (2019). Approaches and limitations in the investigation of synaptic transmission and plasticity. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 11(JUL), 1–16.

<https://doi.org/10.3389/fnsyn.2019.00020>

Gold, P. E., & van Buskirk, R. (1978). Posttraining brain norepinephrine concentrations: Correlation with retention performance of avoidance training and with peripheral epinephrine modulation of memory processing. *Behavioral Biology*, 23(4), 509–520.

[https://doi.org/10.1016/S0091-6773\(78\)91614-0](https://doi.org/10.1016/S0091-6773(78)91614-0)

Greengard, P. (2001). The neurobiology of dopamine signaling. *Bioscience Reports*, 21(3), 247–269. <https://doi.org/10.1023/A:1013205230142>

Gunaydin, L. A., Yizhar, O., Berndt, A., Sohal, V. S., Deisseroth, K., & Hegemann, P. (2010). Ultrafast optogenetic control. *Nature Neuroscience*, 13(3), 387–392.

<https://doi.org/10.1038/nn.2495>

Gurden, H., Tassin, J. P., & Jay, T. M. (1999). Integrity of the mesocortical dopaminergic system is necessary for complete expression of in vivo hippocampal-prefrontal cortex long-term potentiation. *Neuroscience*, 94(4), 1019–1027. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(99\)00395-4](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(99)00395-4)

Hao, L., Yang, Z., & Lei, J. (2018). Underlying mechanisms of cooperativity, input specificity, and associativity of long-term potentiation through a positive feedback of local protein synthesis. *Frontiers in Computational Neuroscience*, 12(May), 1–15.

<https://doi.org/10.3389/fncom.2018.00025>

He, K., Huertas, M., Hong, S. Z., Tie, X. X., Hell, J. W., Shouval, H., & Kirkwood, A. (2015). Distinct Eligibility Traces for LTP and LTD in Cortical Synapses. *Neuron*, 88(3), 528–538. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.09.037>

Hersi, A. I., Rowe, W., Gaudreau, P., & Quirion, R. (1995). Dopamine D1, receptor ligands modulate cognitive performance and hippocampal acetylcholine release in memory-impaired aged rats. *Neuroscience*, 69(4), 1067–1074. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00319-E](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00319-E)

Huang, S., Rozas, C., Treviño, M., Contreras, J., Yang, S., Song, L., Yoshioka, T., Lee, H.-K., & Kirkwood, A. (2014). *Brief Communications Associative Hebbian Synaptic Plasticity in Primate Visual Cortex*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0983-14.2014>

Huang, Y. Y., & Kandel, E. R. (1995). D1/D5 receptor agonists induce a protein synthesis-

- dependent late potentiation in the CA1 region of the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(7), 2446–2450. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.7.2446>
- Im, K., Mareninov, S., Fernando, M., Diaz, P., & Yong, W. H. (n.d.). *An introduction to Performing Immunofluorescence Staining*. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_26
- Impey, S., Obrietan, K., Wong, S. T., Poser, S., Yano, S., Wayman, G., Deloulme, J. C., Chan, G., & Storm, D. R. (1998). Cross talk between ERK and PKA is required for Ca²⁺ stimulation of CREB-dependent transcription and ERK nuclear translocation. *Neuron*, 21(4), 869–883. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80602-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80602-9)
- Janak, P. H., & Tye, K. M. (2015). From circuits to behaviour in the amygdala. In *Nature* (Vol. 517, Issue 7534, pp. 284–292). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nature14188>
- Johansen, J. P., Diaz-Mataix, L., Hamanaka, H., Ozawa, T., Ycu, E., Koivumaa, J., Kumar, A., Hou, M., Deisseroth, K., Boyden, E. S., & LeDoux, J. E. (2014). Hebbian and neuromodulatory mechanisms interact to trigger associative memory formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(51), E5584–E5592. <https://doi.org/10.1073/pnas.1421304111>
- Kandel. (2001). The molecular biology of memory storage: A dialogue between genes and synapses. In *Science* (Vol. 294, Issue 5544, pp. 1030–1038). Science. <https://doi.org/10.1126/science.1067020>
- Kandel, E. R. (2013). *PRINCIPLES OF NEURAL SCIENCE*.
- Katritch, V., Cherezov, V., & Stevens, R. C. (2012). Diversity and modularity of G protein-coupled receptor structures. In *Trends in Pharmacological Sciences* (Vol. 33, Issue 1, pp. 17–27). Trends Pharmacol Sci. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2011.09.003>
- Kauer, J. A., & Malenka, R. C. (2007). Synaptic plasticity and addiction. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(11), 844–858. <https://doi.org/10.1038/nrn2234>
- Khundrakpam, B. S., Reid, A., Brauer, J., Carbonell, F., Lewis, J., Ameis, S., Karama, S., Lee, J., Chen, Z., Das, S., & Evans, A. C. (2013). Developmental changes in organization of structural brain networks. *Cerebral Cortex*, 23(9), 2072–2085. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhs187>
- Klapoetke, N. C., Murata, Y., Kim, S. S., Pulver, S. R., Birdsey-Benson, A., Cho, Y. K., Morimoto, T. K., Chuong, A. S., Carpenter, E. J., Tian, Z., Wang, J., Xie, Y., Yan, Z.,

- Zhang, Y., Chow, B. Y., Surek, B., Melkonian, M., Jayaraman, V., Constantine-Paton, M., ... Boyden, E. S. (2014). Independent optical excitation of distinct neural populations. *Nature Methods*, *11*(3), 338–346. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2836>
- Kutlu, M. G., Burke, D., Slade, S., Hall, B. J., Rose, J. E., & Levin, E. D. (2013). Role of insular cortex D1 and D2 dopamine receptors in nicotine self-administration in rats. *Behavioural Brain Research*, *256*, 273–278. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2013.08.005>
- Lammel, S., Lim, B. K., & Malenka, R. C. (2014). Reward and aversion in a heterogeneous midbrain dopamine system. In *Neuropharmacology* (Vol. 76, Issue PART B, pp. 351–359). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.03.019>
- Lammel, S., Lim, B. K., Ran, C., Huang, K. W., Betley, M. J., Tye, K. M., Deisseroth, K., & Malenka, R. C. (2012). Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. *Nature*, *491*(7423), 212–217. <https://doi.org/10.1038/nature11527>
- Lamprecht, R., & LeDoux, J. (2004). Structural plasticity and memory. *Nature Reviews Neuroscience*, *5*(1), 45–54. <https://doi.org/10.1038/nrn1301>
- Lisman, J., Yasuda, R., & Raghavachari, S. (2012). Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nature Reviews Neuroscience*, *13*(3), 169–182. <https://doi.org/10.1038/nrn3192>
- Liu, Y., Cui, L., Schwarz, M. K., Dong, Y., & Schlüter, O. M. (2017). Adrenergic Gate Release for Spike Timing-Dependent Synaptic Potentiation. *Neuron*, *93*(2), 394–408. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2016.12.039>
- Lombroso, P., & Ogren, M. (2009). Learning and memory, part II: Molecular mechanisms of synaptic plasticity. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, *48*(1), 5–9. <https://doi.org/10.1097/CHI.0b013e318190c4b3>
- Lüscher, C., & Malenka, R. C. (2011). Drug-Evoked Synaptic Plasticity in Addiction: From Molecular Changes to Circuit Remodeling. In *Neuron* (Vol. 69, Issue 4, pp. 650–663). Neuron. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.01.017>
- Ma, T., Cheng, Y., Roltsch Hellard, E., Wang, X., Lu, J., Gao, X., Huang, C. C. Y., Wei, X. Y., Ji, J. Y., & Wang, J. (2018). Bidirectional and long-lasting control of alcohol-seeking behavior by corticostriatal LTP and LTD. *Nature Neuroscience*, *21*(3), 373–383. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0081-9>
- Magaki, S., Hojat, S. A., Wei, B., So, A., & Yong, W. H. (2019). An introduction to the performance of immunohistochemistry. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1897, pp. 289–298). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_25

- Martin, S. J., Grimwood, P. D., & Morris, R. G. M. (2000). Synaptic plasticity and memory: An evaluation of the hypothesis. In *Annual Review of Neuroscience* (Vol. 23, pp. 649–711). *Annu Rev Neurosci*. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.23.1.649>
- Matthies, H., Becker, A., Schröder, H., Kraus, J., Höllt, V., & Krug, M. (1997). Dopamine D1-deficient mutant mice do not express the late phase of hippocampal long-term potentiation. *NeuroReport*, *8*(16), 3533–3535. <https://doi.org/10.1097/00001756-199711100-00023>
- Mayer, M. L., Westbrook, G. L., & Guthrie, P. B. (1984). Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature*, *309*(5965), 261–263. <https://doi.org/10.1038/309261a0>
- McGaugh, J. L. (2000). Memory - A century of consolidation. *Science*, *287*(5451), 248–251. <https://doi.org/10.1126/science.287.5451.248>
- Meister, M., Wong, R. O. L., Baylor, D. A., & Shatz, C. J. (1991). Synchronous bursts of action potentials in ganglion cells of the developing mammalian retina. *Science*, *252*(5008), 939–943. <https://doi.org/10.1126/science.2035024>
- Mejias-Aponte, C. A. (2016). Specificity and impact of adrenergic projections to the midbrain dopamine system. In *Brain Research* (Vol. 1641, Issue Pt B, pp. 258–273). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.01.036>
- Miranda, M. I., & McGaugh, J. L. (2004). Enhancement of inhibitory avoidance and conditioned taste aversion memory with insular cortex infusions of 8-Br-cAMP: Involvement of the basolateral amygdala. *Learning and Memory*, *11*(3), 312–317. <https://doi.org/10.1101/lm.72804>
- Mockett, B. G., Guévremont, D., Williams, J. M., & Abraham, W. C. (2007). Dopamine D1/D5 receptor activation reverses NMDA receptor-dependent long-term depression in rat hippocampus. *Journal of Neuroscience*, *27*(11), 2918–2926. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0838-06.2007>
- Nabavi, S., Fox, R., Proulx, C. D., Lin, J. Y., Tsien, R. Y., & Malinow, R. (2014). Engineering a memory with LTD and LTP. *Nature*, *511*(7509), 348–352. <https://doi.org/10.1038/nature13294>
- Naqvi, N. H., Rudrauf, D., Damasio, H., & Bechara, A. (2007). Damage to the insula disrupts addiction to cigarette smoking. *Science*, *315*(5811), 531–534. <https://doi.org/10.1126/science.1135926>
- Nasser, H. M., Lafferty, D. S., Lesser, E. N., Bacharach, S. Z., & Calu, D. J. (2017).

Disconnection of basolateral amygdala and insular cortex disrupts conditioned approach in Pavlovian lever autoshaping. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2017.11.010>

National Institute on Drug abuse (NIDA). (2020). *Drug Misuse and Addiction | National Institute on Drug Abuse (NIDA)*. National Intitute on Drug Abuse.
<https://www.drugabuse.gov/publications/drugs-brains-behavior-science-addiction/drug-misuse-addiction>

Nicoll, R. A. (2017). A Brief History of Long-Term Potentiation. *Neuron*, 93(2), 281–290.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.12.015>

Nicoll, R. A., & Roche, K. W. (2013). Long-term potentiation: Peeling the onion. In *Neuropharmacology* (Vol. 74, pp. 18–22).
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.02.010>

Ohara, P. T., Granato, A., Moallem, T. M., Wang, B. R., Tillet, Y., & Jasmin, L. (2003). Dopaminergic input to GABAergic neurons in the rostral agranular insular cortex of the rat. *Journal of Neurocytology*, 32(2), 131–141.
<https://doi.org/10.1023/B:NEUR.0000005598.09647.7f>

Osorio-Gómez, D., Guzmán-Ramos, K., & Bermúdez-Rattoni, F. (2016). Corrigendum to “Differential involvement of glutamatergic and catecholaminergic activity within the amygdala during taste aversion retrieval on memory expression and updating” [Behav. Brain Res. 307 (2016) 120-125]. *Behavioural Brain Research*, 311, 441.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27260351>

Otani, S., Bai, J., & Blot, K. (2015). Dopaminergic modulation of synaptic plasticity in rat prefrontal neurons. In *Neuroscience Bulletin* (Vol. 31, Issue 2, pp. 183–190). Science Press. <https://doi.org/10.1007/s12264-014-1507-3>

Pawlak, V., Wickens, J. R., Kirkwood, A., & Kerr, J. N. D. (2010). Timing is not everything: Neuromodulation opens the STDP gate. In *Frontiers in Synaptic Neuroscience* (Issue OCT). <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2010.00146>

Pignatelli, M., & Bonci, A. (2015a). Review Role of Dopamine Neurons in Reward and Aversion: A Synaptic Plasticity Perspective. *Neuron*, 86, 1145–1157.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.04.015>

Pignatelli, M., & Bonci, A. (2015b). Role of Dopamine Neurons in Reward and Aversion: A Synaptic Plasticity Perspective. *Neuron*, 86(5), 1145–1157.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.04.015>

Pushparaj, A., & Le Foll, B. (2015). Involvement of the caudal granular insular cortex in

- alcohol self-administration in rats. *Behavioural Brain Research*, 293, 203–207.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.07.044>
- Ramon Cajal, S. (1894). The Croonian lecture.—La fine structure des centres nerveux. *Proceedings of the Royal Society of London*, 55(331–335), 444–468.
<https://doi.org/10.1098/rspl.1894.0063>
- Riout-Pedotti, M. S., Friedman, D., Hess, G., & Donoghue, J. P. (1998). Strengthening of horizontal cortical connections following skill learning. *Nature Neuroscience*, 1(3), 230–234. <https://doi.org/10.1038/678>
- Rodríguez-Durán, L. F., Martínez-Moreno, A., & Escobar, M. L. (2016). *Bidirectional modulation of taste aversion extinction by insular cortex LTP and LTD*.
<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.12.014>
- Rogan, M. T., Staubli, U. V., & LeDoux, J. E. (1997). Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature*, 390(6660), 604–607.
<https://doi.org/10.1038/37601>
- Rowan, B. A., Seymour, D. K., Chae, E., Lundberg, D. S., & Weigel, D. (2017). Methods for genotyping-by-sequencing. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1492, pp. 221–242). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6442-0_16
- Russo, S. J., & Nestler, E. J. (2013). The brain reward circuitry in mood disorders. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 14, Issue 9, pp. 609–625). Nat Rev Neurosci.
<https://doi.org/10.1038/nrn3381>
- Schulz, J. M., Redgrave, P., & Reynolds, J. N. J. (2010). Cortico-striatal spike-timing dependent plasticity after activation of subcortical pathways. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 2(JUL). <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2010.00023>
- Seamans, J. K., & Yang, C. R. (2004a). The principal features and mechanisms of dopamine modulation in the prefrontal cortex. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 74, Issue 1, pp. 1–58). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2004.05.006>
- Seamans, J. K., & Yang, C. R. (2004b). The principal features and mechanisms of dopamine modulation in the prefrontal cortex. *Progress in Neurobiology*, 74(1), 1–58.
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2004.05.006>
- See, R. E. (2002). Neural substrates of conditioned-cued relapse to drug-seeking behavior. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 71(3), 517–529.
[https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(01\)00682-7](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(01)00682-7)

- Seol, G. H., Ziburkus, J., Huang, S. Y., Song, L., Kim, I. T., Takamiya, K., Hugarir, R. L., Lee, H. K., & Kirkwood, A. (2007). Neuromodulators Control the Polarity of Spike-Timing-Dependent Synaptic Plasticity. *Neuron*, *55*(6), 919–929. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2007.08.013>
- Shi, C. J., & Cassell, M. D. (1998). Cortical, thalamic, and amygdaloid connections of the anterior and posterior insular cortices. *Journal of Comparative Neurology*, *399*(4), 440–468. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19981005\)399:4<440::AID-CNE2>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19981005)399:4<440::AID-CNE2>3.0.CO;2-1)
- Song, S., Miller, K. D., & Abbott, L. F. (2000). Competitive Hebbian learning through spike-timing-dependent synaptic plasticity. *Nature Neuroscience*, *3*(9), 919–926. <https://doi.org/10.1038/78829>
- Squire, L. R. (1992). Memory and the Hippocampus: A Synthesis From Findings With Rats, Monkeys, and Humans. *Psychological Review*, *99*(2), 195–231. <https://doi.org/10.1037/0033-295X.99.2.195>
- Squire, L. R. (2004). Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. *Neurobiology of Learning and Memory*, *82*(3), 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2004.06.005>
- Sweatt, J. D. (2016a). Neural plasticity and behavior – sixty years of conceptual advances. *Journal of Neurochemistry*, *139*, 179–199. <https://doi.org/10.1111/jnc.13580>
- Sweatt, J. D. (2016b). Neural plasticity and behavior - sixty years of conceptual advances. *Journal of Neurochemistry*, *139*, 179–199. <https://doi.org/10.1111/jnc.13580>
- Tibbetts, P. E. (2013). Principles of Neural Science . Fifth Edition. Edited by Eric R. Kandel, James H. Schwartz, Thomas M. Jessell, Steven A. Siegelbaum, and A. J. Hudspeth; Art Editor:, Sarah Mack. New York: McGraw-Hill. \$135.00. I + 1709 p.; ill.; index. ISBN: 978-0-07-13901. *The Quarterly Review of Biology*, *88*(2), 139–140. <https://doi.org/10.1086/670559>
- Tsai, H. C., Zhang, F., Adamantidis, A., Stuber, G. D., Bond, A., De Lecea, L., & Deisseroth, K. (2009). Phasic firing in dopaminergic neurons is sufficient for behavioral conditioning. *Science*, *324*(5930), 1080–1084. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1168878>
- Uematsu, A., Kitamura, A., Iwatsuki, K., Uneyama, H., & Tsurugizawa, T. (2015). Correlation between activation of the prelimbic cortex, basolateral amygdala, and agranular insular cortex during taste memory formation. *Cerebral Cortex*, *25*(9), 2719–2728. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhu069>

- Uwano, T., Nishijo, H., Ono, T., & Tamura, R. (1995). Neuronal responsiveness to various sensory stimuli, and associative learning in the rat amygdala. *Neuroscience*, *68*(2), 339–361. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00125-3](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00125-3)
- Volianskis, A., France, G., Jensen, M. S., Bortolotto, Z. A., Jane, D. E., & Collingridge, G. L. (2015). Long-term potentiation and the role of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Research*, *1621*, 5–16. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.01.016>
- Whitlock, J. R., Heynen, A. J., Shuler, M. G., & Bear, M. F. (2006). Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science*, *313*(5790), 1093–1097. <https://doi.org/10.1126/science.1128134>
- Xie, Y., Jackson, M. F., & MacDonald, J. F. (2013). Optogenetics and synaptic plasticity. *Acta Pharmacologica Sinica*, *34*(11), 1381–1385. <https://doi.org/10.1038/aps.2013.150>
- Xu, T.-X., & Yao, W.-D. (2010). D1 and D2 dopamine receptors in separate circuits cooperate to drive associative long-term potentiation in the prefrontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(37), 16366–16371. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1004108107>
- Xue, B., Mao, L. M., Jin, D. Z., & Wang, J. Q. (2015). Regulation of synaptic MAPK/ERK phosphorylation in the rat striatum and medial prefrontal cortex by dopamine and muscarinic acetylcholine receptors. *Journal of Neuroscience Research*, *93*(10), 1592–1599. <https://doi.org/10.1002/jnr.23622>
- Yagishita, S., Hayashi-Takagi, A., Ellis-Davies, G. C. R., Urakubo, H., Ishii, S., & Kasai, H. (2014). A critical time window for dopamine actions on the structural plasticity of dendritic spines. *Science*, *345*(6204), 1616–1620. <https://doi.org/10.1126/science.1255514>
- Yao, H., & Dan, Y. (2001). Stimulus timing-dependent plasticity in cortical processing of orientation. *Neuron*, *32*(2), 315–323. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00460-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00460-3)
- Yizhar, O., Fenno, L. E., Davidson, T. J., Mogri, M., & Deisseroth, K. (2011). Optogenetics in Neural Systems. In *Neuron* (Vol. 71, Issue 1, pp. 9–34). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.06.004>
- Zucker, R. S., & Regehr, W. G. (2002). Short-term synaptic plasticity. *Annual Review of Physiology*, *64*, 355–405. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.64.092501.114547>