



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE PSICOLOGIA

"EFECTOS DEL FACTOR NEUROTROFICO DERIVADO DEL  
CEREBRO (BDNF) SOBRE EL CONDICIONAMIENTO  
AVERSIVO A LOS SABORES (CAS)".

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
LICENCIADA EN PSICOLOGIA  
P R E S E N T A :  
DIANA VERONICA CASTILLO PADILLA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARTHA LILIA ESCOBAR RODRIGUEZ  
ASESOR DE TESIS: LIC. HUGO SANCHEZ CASTILLO

Ψ

UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO.



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. PSICOLOGIA.

MEXICO, D. F.,

2004

El estudio objeto de la presente tesis fue posible  
gracias al apoyo del CONACYT proyecto  
(38511-M) y del PAPIIT proyecto (IN213503).



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.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Diana Verónica

Castillo Padilla

FECHA: 3/mayo/2004

FIRMA: ~~[Firma]~~

***La huella significa el signo presente de una cosa ausente, el rastro que lo ahora ausente ha dejado tras su paso por los lugares donde estuvo presente.***

Jaques Derrida



## DEDICATORIA

*En memoria de mi abuelita manuela, por que tu herencia se ha quedado y tu recuerdo perdurará, de tu chula. A mis abuelos quienes me enseñaron que la narración y formación de la historia se realiza con el recuerdo de los mejores momentos y por que fueron los orígenes de mi historia.*

## *Agradecimientos*

A mis padres y familia por su apoyo pero sobre todo por su amor, gracias pá.

A mi directora de tesis Martha Lilia Escobar Rodríguez quien me ha enseñado que la neurociencia se realiza con constancia, honestidad y esfuerzo, gracias.

A mis sinodales: Alfonso Salgado, Cesar Casasola, Gabriela Orozco y Hugo Sánchez por sus importantes sugerencias y comentarios para mejorar esta tesis.

A Daphné mi amiga por tu apoyo incondicional, por que eres una huella de mi vida y recuerda que PSA.

A mi cajita de recuerdos silenciosa a quien tuve la suerte de conocer y a quien jamás olvidaré, gracias Norma por ser parte de mi historia y por apoyarme siempre.

A mis amigas con quienes mi parte oculta se descubre y con quienes el lenguaje nos une Liliana y Macuil Xochitl.

A mis amigas que han formado mis recuerdos Karlita y Sofi con quienes aprendí y me enseñé a vivir.

A mis amigos de toda la vida Pepe, Héctor y Raúl quienes dejaron una huella en mí y nunca podré borrar, los amo.

A mis amigos del laboratorio de investigación Andrea y Laurita mil gracias por su cariño y ayuda, gracias Luis por tu amistad. A Olga por sus enseñanzas. Gracias a todos por disfrutar conmigo de las Neurociencias.

A mis amigos los alternativos con quienes disfruté de recuerdos y experiencias en las islas y en muchas otras partes: Orela, Fernanda, Fidel, Chuchito, Chayo, Nancita, Nancy, Gerardo, Evelin, etc. y a aquellos con quienes he seguido una utopía.

A mis amigos (as) Lizeth, Adriana, Mauricio, Gabriel, Arturo, Lupe por su recuerdo.

Gracias Mellita por todos tus consejos y porras, eres el mejor ejemplo de que la vida es simple, te quiero.

A toda la gente que me ha apoyado y quienes han sido importantes en mi vida, gracias por haberme acompañado.

A mi Universidad por darme todo para lograr realizar esta tesis.

## **“EFECTOS DEL FACTOR NEUROTROFICO DERIVADO DEL CEREBRO SOBRE EL CONDICIONAMIENTO AVERSIVO A LOS SABORES”**

Los mecanismos celulares que subyacen al almacenamiento de información en el sistema nervioso no han sido del todo esclarecidos, sin embargo se ha observado la participación de algunas moléculas. Una de estas moléculas es el BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro. Estudios recientes muestran la participación del BDNF en los cambios plásticos a largo plazo en el sistema nervioso central adulto relacionados con el aprendizaje y la memoria. La Potenciación a Largo Plazo (LTP, por sus siglas en inglés), es un modelo celular relacionado con los cambios que subyacen al aprendizaje y la memoria, traducido al incremento prolongado de la eficacia sináptica, debido a la estimulación repetitiva de las aferencias a un área determinada del Sistema Nervioso Central, descrito inicialmente por Bliss y Lomo en 1973. Investigaciones recientes han demostrado que el BDNF juega un papel importante para la inducción y mantenimiento de la LTP. La LTP ha sido subsecuentemente observada en diversas regiones cerebrales entre las que se encuentra la neocorteza, tal es el caso de la corteza insular (CI). La corteza insular es un área involucrada en la adquisición y almacenamiento de tareas aversivas como el condicionamiento aversivo a los sabores (CAS). La corteza insular tiene importantes conexiones con el núcleo amigdalino basolateral (Bla), lo que influye en su relación con el aprendizaje de tareas aversivas. Recientes investigaciones demuestran que la inducción de LTP en la proyección (Bla-CI) previa al entrenamiento del CAS, aumenta la retención de esta tarea, así como que el BDNF es capaz de inducir por sí solo un fenómeno similar a la LTP en la corteza insular, en ausencia de estimulación de alta frecuencia (Escobar et al., 2000; Escobar et al., 2003). El objetivo del presente estudio fue observar los efectos que tiene el BDNF infundido en la CI sobre el condicionamiento aversivo a los sabores. Para la presente investigación se utilizaron ratas de la cepa Wistar con un peso corporal de 350-380g a las que se microinfundió BDNF o las correspondientes sustancias control. La división experimental de los sujetos fue la siguiente: grupo PBS al que se administró amortiguador de fosfatos como vehículo; grupo BDNF al que se administró la neurotrofina; grupo CYT-C al que se administró citocromo-C, como control protéico; grupo (BDNF+K252a), al que se administró una combinación de BDNF con un antagonista de los receptores Trk, y grupo control CON, que permaneció intacto sin la administración de ningún fármaco y sin implantación de cánulas. Los resultados del experimento mostraron que la microinfusión intracortical aguda de BDNF (en concentraciones capaces de inducir LTP en ausencia de estimulación tetánica) en la corteza insular de ratas adultas, incrementa significativamente la retención del condicionamiento aversivo a los sabores. Estos resultados sugieren la participación del BDNF en los mecanismos que subyacen al aprendizaje y la memoria en la corteza insular. El grupo infundido con BDNF presenta diferencias significativas en los procesos de almacenamiento más que sobre los de adquisición efectuados por la corteza insular. La convergencia entre los patrones de señalización activados por BDNF/TrkB y por la estimulación capaz de inducir LTP, coadyuva a la comprensión de los mecanismos celulares que subyacen a los cambios en la eficiencia sináptica implicados en los procesos de aprendizaje y memoria.

## ÍNDICE

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>2. ANTECEDENTES.....</b>   | <b>2</b>  |
| <b>2.1. Los factores neurotróficos y el sistema nervioso central.....</b> | <b>3</b>  |
| 2.1.1. Aspectos generales de las neurotrofinas.....                       | 3         |
| 2.1.2. Factor neurotrófico derivado del cerebro.....                      | 5         |
| <b>2.2. Potenciación a Largo Plazo.....</b>                               | <b>7</b>  |
| 2.2.1. Características de la LTP.....                                     | 7         |
| 2.2.2. Mecanismos moleculares de la LTP.....                              | 10        |
| 2.2.3. BDNF y LTP.....  | 14        |
| 2.2.4. LTP en la neocorteza.....  | 16        |
| <b>2.3. Corteza insular.....</b>  | <b>17</b> |
| 2.3.1. Características fisiológicas y anatómicas.....                     | 17        |
| 2.3.2. Aferencias gustativas de la corteza insular.....                   | 19        |
| 2.3.3. Condicionamiento aversivo a los sabores.....                       | 20        |
| 2.3.4. Corteza insular y CAS.....   | 22        |
| 2.3.5. La amígdala y el CAS.....  | 23        |
| <b>2.4. BDNF, LTP y CAS.....</b>  | <b>24</b> |
| <b>3. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN.....</b>                              | <b>26</b> |
| <b>4. OBJETIVOS.....</b>  | <b>27</b> |
| <b>5. METODOLOGÍA.....</b>  | <b>27</b> |
| <b>6. RESULTADOS.....</b>   | <b>31</b> |
| <b>7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....</b>                                   | <b>45</b> |
| <b>8. REFERENCIAS.....</b>  | <b>49</b> |

## 1. INTRODUCCIÓN

En 1894 Ramón y Cajal propuso que la memoria podría almacenarse a través de cambios anatómicos producidos por la modificación de la fortaleza en la transmisión sináptica; más tarde en 1949 Donald Hebb propuso que las conexiones sinápticas pueden fortalecerse cuando las neuronas presinápticas y postsinápticas son activadas simultáneamente (citado por Kandel, 2001). Derivada de la convergencia entre la psicología cognitiva y la neurobiología surge la neurociencia cognitiva que entre sus múltiples objetivos se encuentra el dilucidar los mecanismos que subyacen al procesamiento y almacenamiento de información en el sistema nervioso. Actualmente sabemos que el almacenamiento de la memoria en el cerebro de los mamíferos puede dissociarse en: memoria de corto plazo y memoria de largo plazo (Polster et al., 1991; Bailey y Kandel, 1993; Kandel, 2001), una de las diferencias fundamentales a nivel celular es que la memoria de corto plazo requiere solo de modificaciones covalentes, mientras la memoria de largo plazo requiere de síntesis de proteínas y de nuevo ARN m (Bailey y Kandel, 1993; Tully et al., 1994). La adquisición de la memoria involucra cambios a corto plazo de las propiedades eléctricas mientras que la memoria a largo plazo involucra alteración estructural de la sinapsis (Burns y Augustine, 1995; Edwards, 1995; Yamada et al., 2002). El BDNF es una proteína involucrada en el crecimiento, mantenimiento y sobrevivencia de poblaciones neuronales durante el desarrollo. Estudios recientes muestran la participación de esta proteína en los cambios plásticos a largo plazo en el sistema nervioso central adulto (SNC) relacionados con el aprendizaje y la memoria (McAllister et al., 1999; Tyler et al., 2002; Yamada et al., 2002). Un modelo celular ampliamente relacionado con los procesos que subyacen a la retención de información por tiempos prolongados es la potenciación a largo plazo. La LTP fue descrita inicialmente por Bliss y Lomo en 1973 en las células granulares del giro dentado hipocampal. Investigaciones recientes han demostrado que el BDNF juega un papel importante para la inducción y mantenimiento de la LTP (Korte et al., 1995; Kang y Schuman, 1995; Levine et al., 1995; Patterson et al., 1996). La LTP ha sido subsecuentemente observada en diversas regiones cerebrales entre las que se encuentra la neocorteza (Komatsu et al., 1981, 1988; Artola y Singer, 1990; Hirsch y

Crepel, 1990; Lee et al., 1991), tal es el caso de la corteza insular (Escobar et al., 1998). La corteza insular es un área involucrada en la adquisición y almacenamiento de tareas aversivas como el condicionamiento aversivo a los sabores (CAS), un paradigma ampliamente utilizado por sus implicaciones de sobrevivencia y adaptación en las especies. La corteza insular tiene importantes conexiones con la amígdala, específicamente con el núcleo basolateral lo que influye en su relación con el aprendizaje de tareas aversivas. Recientemente se ha demostrado que la inducción de LTP en la proyección amígdala basolateral, corteza insular (Bla-CI) previa al entrenamiento del CAS, incrementa significativamente la retención de esta tarea, (Escobar et al., 2000). Un estudio reciente demostró que la microinfusión de BDNF en la CI induce un fenómeno similar a la LTP, en ausencia de estimulación eléctrica de alta frecuencia (Escobar et al., 2003). Por lo anterior el objetivo del presente estudio fue estudiar los efectos que tiene el BDNF infundido en la CI sobre el condicionamiento aversivo a los sabores.

## **2. ANTECEDENTES**

El aprendizaje y la memoria son dos procesos que implican la adaptación de los circuitos cerebrales al ambiente. Esto permite que podamos responder a las diferentes situaciones que experimentamos.

A lo largo de los años, muchos investigadores se han preocupado por conocer el substrato neurobiológico del aprendizaje y la memoria. Estas investigaciones se han realizado en dos grandes ramas. Una de estas, es la de los científicos que se encargan de estudiar qué partes del cerebro se ven involucradas en los procesos de aprendizaje y memoria. La otra se ha encargado de encontrar cómo se almacena la información.

Uno de los objetivos de la neurociencia cognitiva es tratar de explicar los mecanismos celulares que subyacen a la formación de la memoria y el aprendizaje. Algunas moléculas fuertemente involucradas en tales mecanismos son las neurotrofinas.



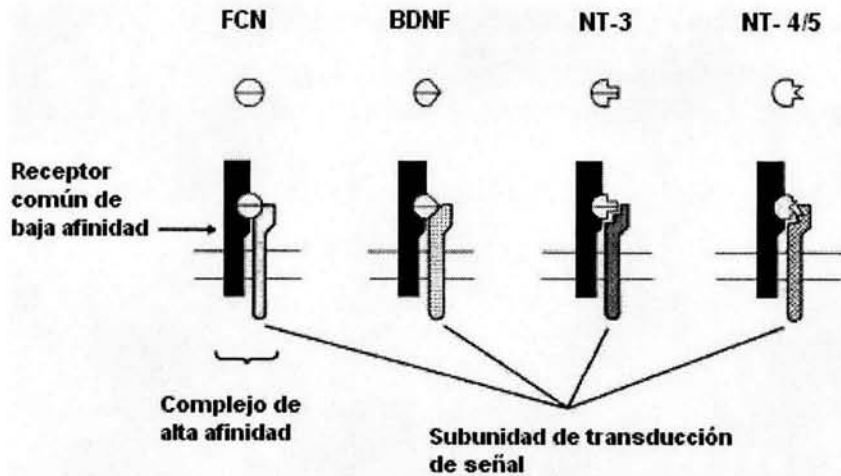
## **2.1. Los factores neurotróficos y el sistema nervioso central**

### **2.1.1. Aspectos generales de las neurotrofinas**

La diversidad celular en el sistema nervioso se origina a partir de la acción concertada de los procesos de proliferación celular, diferenciación, crecimiento, migración, sobrevivencia y formación de las sinápsis. Entre los mensajeros involucrados en la comunicación neuronal, que da origen a estos procesos, se encuentran ciertas moléculas denominadas factores tróficos o factores neurotróficos (FNT), que son proteínas que controlan la sobrevivencia, el crecimiento y las capacidades funcionales de poblaciones específicas de neuronas (Escobar, 1994). El estudio de los FNT ha llevado a la postulación de la hipótesis neurotrófica del sistema nervioso central, que señala lo siguiente (Varón, 1985):

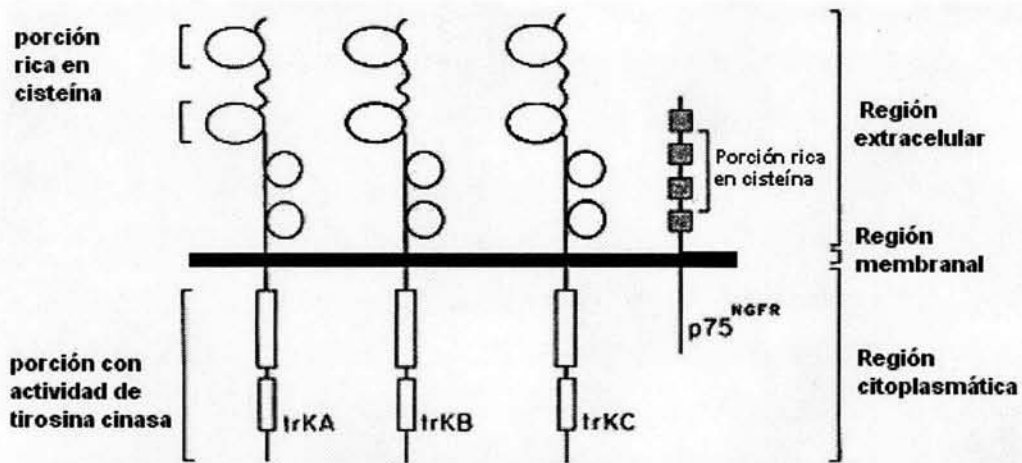
- 1) Las neuronas del SNC adulto dependen de sus FNT para su mantenimiento, función y reparación.
- 2) Los FNT endógenos son liberados por sus territorios de inervación (parejas post-sinápticas y glía).
- 3) Deficiencias en los FNT endógenos originan trastornos neuronales: disfunción, hipotrofia y degeneración.
- 4) La administración exógena de FNT previene y/o corrige los daños o trastornos producidos por lesiones crónicas o agudas.
- 5) Los FNT pueden ayudar al tratamiento de algunas patologías neurodegenerativas humanas.

Los factores neurotróficos pueden agruparse convenientemente en familias, tomando en consideración dos criterios: a ) las poblaciones celulares sobre las que actúan, es decir considerando sus células blanco y b) por su estructura, puesto que algunos factores neurotróficos presentan obvias similitudes estructurales en sus secuencias aminoacídicas (Escobar,1994). La familia de las neurotrofinas está constituida por los siguientes miembros: factor de crecimiento neuronal (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina 3 (NT-3) y neurotrofina 4/5 (NT-4/5) [Fig. 1].



**Figura 1.** Estructuras hipotéticas de los receptores de alta afinidad de las neurotrofinas. Se ha propuesto que sus complejos de alta afinidad se forman tras la adición de una segunda subunidad (Escobar, 1994).

Las neurotrofinas efectúan sus acciones mediante dos clases de receptores, los de alta afinidad, como la tirosina cinasa (receptores Trk) y los receptores de baja afinidad como los p75 (Bothwell, 1991; Chao, 1992; Meakin y Shooter, 1992; Barbacid, 1994; Dechant et al., 1994; Lindsay et al., 1994; Ip y Yancopolus, 1996; Segal y Greenberg, 1996) [Fig. 2].



**Figura 2.** Esquema de la familia de receptores y el receptor P75 que es capaz de unirse a todas las neurotrofinas (Modificado de Escobar, 1994).



Se piensa que las neurotrofinas son transferidas de la célula presináptica a la postsináptica (Collin et al., 2001), sin embargo, evidencias recientes muestran como las neurotrofinas pueden ser igualmente transferidas de manera retrógrada, como los neurotransmisores (Kohara et al., 2001). Las neurotrofinas son transportadas en gránulos secretores, su secreción en el SNC tiene lugar fundamentalmente en forma regulada por actividad sináptica. Actualmente no existe evidencia clara de una liberación verdaderamente constitutiva de las neurotrofinas bajo condiciones fisiológicas (Poo, 2001).

El descubrimiento de que el proto-oncogen TrkA codifica para el receptor de NGF, coadyuvó a la identificación de las neurotrofinas, como ligandos para la denominada familia de receptores Trk, los cuales poseen actividad de tirosinas cinasas. Algunos genes estrechamente relacionados con el TrkA tales como TrkB y TrkC, codifican proteínas que actúan como receptores para BDNF, NT-3 y NT- 4/5 respectivamente (Ip et al., 1992).

### **2.1.2. El Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)**

El BDNF es una molécula neurotrófica, cuyo peso molecular es de 27 KDa que fue originalmente aislada del cerebro de cerdo. Actualmente sabemos que forma parte del SNC de los mamíferos en particular en el hipocampo y la neocorteza. Recientes investigaciones muestran la presencia de BDNF y sus receptores TrkB en densidades postsinápticas de la corteza cerebral en ratas adultas (Aoki et al., 2000). Después de haber aislado al BDNF se comparó su secuencia y se encontró que era parcialmente homóloga a la del NGF. A la fecha se ha secuenciado el BDNF de distintas especies, encontrando una conservación evolutiva incluso mucho mayor a la del NGF (Boulton et al., 1993).

Una propiedad fundamental de los "blancos" (targets) del BDNF es que se ubican o proyectan hacia alguna área específica del SNC. A pesar de que el factor neurotrófico NGF presenta amplia difusión en el sistema nervioso central, los reportes indican que hay entre 20 y 50 veces más la presencia del BDNF que NGF en el sistema nervioso central de la rata (Escobar, 1994).

La regulación de los niveles de BDNF depende de la actividad neuronal, principalmente en el hipocampo y la neocorteza y algunas otras partes del SNC, así como algunas partes del tejido periférico (aunque en menor cantidad como el corazón, riñón y timo) (Boulton, 1993). Un estudio en el que se utilizó hibridación *in situ* (utilizada para observar la presencia de ARN mensajero de una molécula en determinado lugar) reveló la distribución del BDNF en el hipocampo. Según este estudio se ha encontrado la presencia del BDNF en el estrato piramidal de las regiones CA2 y CA3, con una menor concentración en el área CA1 hipocampal. También se encuentra una alta intensidad de BDNF en la región del *hilus* en el giro dentado, así como en las células granulares en esta misma área (en menor concentración pero con mayor difusión) (Boulton, 1993).

Como se mencionó anteriormente, el BDNF interactúa con un receptor de alta afinidad llamado TrkB. La cadena de señalización que activa esta interacción incluye, la mayoría de las veces una cascada de proteínas cinasas, las cuales se caracterizan por transferir un grupo fosfato a sus sustratos, fosforilando a otras cinasas que translocan el núcleo y esto trae consigo modificaciones en el proceso celular (Finkbeiner et al., 1997; Patapoutian y Reichardt, 2001; Minichiello et al., 2002; Ying et al., 2002) [Fig. 3].

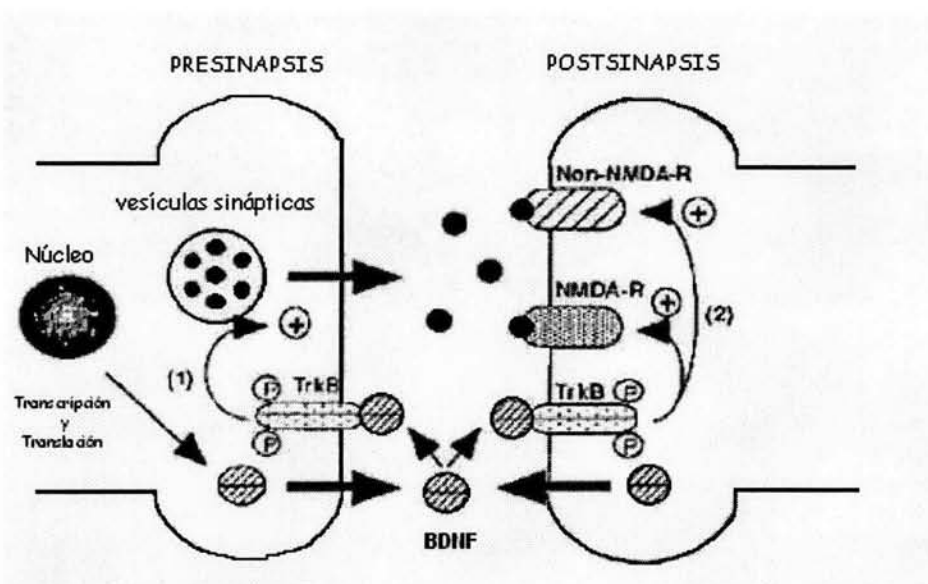


Figura 3. Cascada molecular originada por la unión del BDNF a su receptor TrkB (Yamada, 2002).

## **2.2. Potenciación a Largo Plazo**

### **2.1.1. Características de la LTP**

Las investigaciones que tienen por objeto encontrar el cómo es que se almacena información en el SNC, han encontrado que el aprendizaje y la memoria involucran una serie de alteraciones sinápticas que están profusamente distribuidas en el cerebro (Bear et al., 2001). La memoria, se refleja en la capacidad de las neuronas para modular las respuestas evocadas por un estímulo y para reactivar una respuesta en ausencia del estímulo que la originó (Eichenbaum, 1997). Es por esto que es posible considerar ciertos eventos de neuromodulación (habilidad que presentan las neuronas para alterar sus repuestas eléctricas como consecuencia de cambios bioquímicos intracelulares), resultantes de estimulación sináptica u hormonal, como la base de procesos de plasticidad en el sistema nervioso, tales como el aprendizaje y la memoria. Para entender los procesos de aprendizaje y memoria es necesario recordar que el cerebro se estructura a través de redes neuronales, cuyas neuronas se comunican mediante sinapsis. Se considera a la sinapsis, como el lugar en el que se efectúan las modificaciones que conducen al almacenamiento de información de aquellas neuronas involucradas en ciertos tipos de aprendizaje. Donald Hebb (1949) postuló que cuando “el axón de una célula A está suficientemente cerca para excitar a una célula B y repetida o persistentemente toma parte en su activación, algún cambio de proceso de crecimiento o cambio metabólico tiene lugar en alguna de las dos células, de modo que la eficacia en A para activar a B incrementa”; actualmente conocemos un modelo que puede explicar estas modificaciones plásticas del sistema nervioso. En 1973 Bliss y Lomo encontraron que trenes breves de alta frecuencia aplicados a las aferentes excitatorias del hipocampo de los conejos, causaban un incremento en la fortaleza de la transmisión sináptica que podía durar días e incluso semanas en animales intactos, a lo que se llamó potenciación a largo plazo. Uno de los fenómenos que representa a la plasticidad sináptica es el hallazgo de la potenciación a largo plazo (que se define como el incremento prolongado de la eficiencia sináptica, debido a la

estimulación repetitiva de las fibras aferentes a un área determinada del SNC), constituyó un gran avance en la explicación de los mecanismos involucrados en el almacenamiento de información en el SNC (Bliss y Lomo, 1973), pues se considera que el postulado de Hebb, se ve representado por este fenómeno.

Desde su descubrimiento, la LTP de la transmisión sináptica excitatoria del hipocampo, se ha convertido en uno de los modelos experimentales primarios para examinar los mecanismos del almacenamiento de la información. Además de su persistencia en el tiempo, la LTP posee características que la convierten en una poderosa herramienta para explicar los eventos que a nivel celular, bioquímico o inclusive molecular, subyace a la plasticidad sináptica relacionada con la memoria. Estas características son: la especificidad, la cooperatividad y la asociatividad (Bailey et al., 2000). La especificidad se refiere a, que solamente aquellas fibras que fueron activadas por el estímulo de alta frecuencia van a presentar modificaciones en la respuesta sináptica. La cooperatividad se manifiesta por un fuerte requerimiento en la activación simultánea de las fibras presinápticas, de tal forma que se logre el estímulo necesario para activar la LTP. Finalmente, la asociatividad que se observa cuando la activación de una vía sináptica fuerte es capaz de facilitar en una sinapsis débil en la misma célula (Malenka y Nicoll, 1993).

Para Hebb, la memoria debía ser almacenada a través de la formación de conexiones asociativas entre las neuronas involucradas, sin embargo se han observado eventos de la LTP descritos como no asociativos. La LTP que requiere una activación coincidente de los elementos pre y postsinápticos se llama LTP hebbiana, mientras que aquella que no requiere la activación de dichos elementos es referida como no-hebbiana (Urban y Barrionuevo, 1996). En el hipocampo se ha logrado inducir LTP en varias vías como son la perforante (Bliss y Lomo, 1973; Doyere et al., 1997; Roberts et al., 1997), las colaterales de Schaffer (Debanne et al., 1996; Wang y Steltzer, 1996; Abraham y Hugett, 1997) y las fibras musgosas (Derrick et al., 1991; Nicoll y Malenka, 1995; Escobar et al., 1997). Asimismo, ha logrado inducirse LTP en varias regiones de la corteza (Artola y Singer, 1990; Tsumoto, 1992; Bear y Kirkwood, 1993; Escobar et al., 1998). La relación de este

fenómeno con el procesamiento de información ha sido profusamente estudiada en el hipocampo y en otras regiones del SNC. Algunos de los puntos que hacen pensar a los investigadores que la LTP y los procesos de aprendizaje y memoria son similares son: que la LTP puede operar en las redes de neuronas que se han visto involucradas con procesos de aprendizaje y memoria (hipocampo, amígdala, neocorteza, etc.), dura un lapso prolongado y funciona de manera similar al postulado de Hebb (Martínez y Derrick, 1996). Un ejemplo al respecto de la relación entre LTP, el aprendizaje y memoria es el estudio de Morris (1989), en donde la interrupción de la transmisión sináptica dependiente de los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) en ratas, los cuales se han visto involucrado ampliamente en procesos de aprendizaje y memoria, provoca el bloqueo tanto del aprendizaje en la tarea espacial del laberinto de agua como en la inducción de LTP hipocampal. Evidencias similares se han encontrado con ratones transgénicos que sobreexpresan una subunidad de los receptores NMDA, logrando un incremento en tareas de aprendizaje y facilitación de la LTP (Tang et al., 1999). El bloqueo de la actividad de otras proteínas necesarias para la LTP tales como las proteínas cinasas PKA (proteína cinasa dependiente de AMP cíclico), PKC (proteína cinasa C), CaMK-II (Calcio calmodulina cinasa-II) también implicadas en el establecimiento o mantenimiento de la potenciación a largo plazo, interfieren en mayor o menor grado con la solución de tareas espaciales (Malenka, 1994; Mayford et al., 1996). Por otra parte, al igual que el mantenimiento de la LTP por periodos prolongado, la consolidación de la información es dependiente de la transcripción de proteínas (Davis y Squire, 1984; Matthies, 1989) tanto en invertebrados (Montarolo et al., 1986; Tully, 1991) como en mamíferos (Davis y Squire, 1984; Abel et al., 1997). Algunos estudios sugieren que tanto el almacenamiento de información como la LTP utilizan vías de transducción similares para la regularización de la expresión genética. Se ha encontrado que la actividad de la cinasa PKA es necesaria para la consolidación de información (Huang et al., 1994; Abel et al., 1997). Asimismo, se requiere de la activación de la expresión de genes dependientes del factor de transcripción CREB (proteína responsiva a la unión del AMPc), para la consolidación de la memoria en especies como la *Aplysia californica* (Dash et al., 1990), *Drosophila melanogaster*



(Yin et al., 1994) y en mamíferos (Kogan et al., 1997). A pesar de que todavía existen dudas acerca de la relación de la LTP y los procesos de aprendizaje y memoria, ha sido un modelo útil para estudiar los mecanismos moleculares que conforman a la plasticidad sináptica (Martin y Morris, 2002). La evidencia hasta el momento más sólida a favor de una relación entre el aprendizaje y la LTP, proviene de dos estudios realizados por dos grupos independientes, no en el área del hipocampo sino en la amígdala (McKernan y Shinnick-Gallagher, 1997; Rogan et al. 1997). Los resultados de estos trabajos sugieren que el condicionamiento al miedo, causa incrementos de largo plazo en la eficiencia sináptica en la vía que transmite información auditiva del núcleo geniculado medial del tálamo, a la amígdala lateral. Rogan et al. (1997) demostraron *in vivo* que el condicionamiento al miedo produce incrementos en la pendiente y la amplitud de los potenciales postsinápticos excitatorios (PPSE's) en la amígdala lateral de ratas adultas, similares a los vistos después de inducir LTP *in vivo*. Por otra parte McKernan y Shinnick-Gallagher (1997) demostraron que el entrenamiento en el condicionamiento al miedo produce una facilitación presináptica de la amígdala lateral en preparaciones *in vitro*, 24 hr después del entrenamiento en ratas adultas de dicha tarea. Trabajos anteriores habían mostrado el papel de la amígdala en el condicionamiento al miedo, y la LTP se había propuesto como candidato a ser el mecanismo celular de este aprendizaje (Maren, 1996). Esta serie de estudios sugieren que las vías de señalización molecular requeridas para la memoria de largo plazo del condicionamiento al miedo en la amígdala lateral son las mismas que se requieren durante la inducción y mantenimiento de la LTP en esta tarea (Rogan et al., 1997; Faselow y LeDoux, 1999; Blair et al., 2001; Huang et al. 2000).

### **2.2.2. Mecanismos moleculares de la LTP**

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

del sistema nervioso, utilizan glutamato como neurotransmisor (Kennedy y Marder, 1992). Experimentos realizados utilizando antagonistas de los receptores NMDA, como el AP5, que impiden su activación evitan la inducción de LTP (Collingridge et al., 1983; Harris et al., 1984). Estos receptores se encuentran generalmente inactivos. Durante la actividad normal de las conexiones sinápticas, las terminales presinápticas liberan glutamato en el espacio extracelular y este neurotransmisor activa a los receptores AMPA/kainato de la célula postsináptica, dando lugar a la entrada de sodio al interior de la célula. Los receptores NMDA, también responden a glutamato, pero se encuentran bloqueados por iones de magnesio, lo que impide el flujo iónico a través de ellos. Para eliminar este bloqueo, es necesaria la depolarización de la membrana, lo que ocurre por la entrada de cationes a través de otros canales como el tipo AMPA (Kandel y Hawkins, 1992). Esto otorga a los receptores NMDA la propiedad de funcionar como detectores asociativos, ya que se activan sólo cuando coinciden, la actividad de la célula presináptica y la depolarización de la membrana en la célula postsináptica (Bliss y Collingridge, 1993; Malenka, 1994). Los receptores NMDA tienen además la característica de que al ser activados permiten, no solamente la entrada de iones de sodio al interior de la célula sino que también son permeables al calcio (MacDermot et al., 1986; Jahr y Stevens, 1987; Ascher y Nowak, 1988). Es la entrada de calcio, a través de estos canales y probablemente a través de los canales dependientes de voltaje, lo que hace posible la presencia de la LTP, al provocar cambios en el interior de la célula. La entrada de calcio a la célula postsináptica, a través de los receptores NMDA, activa a la proteína citosólica llamada calmodulina, que funciona como una señal al activar distintas vías de traducción al interior de la célula, haciendo posible el mantenimiento del incremento en la eficiencia sináptica por períodos de tiempo prolongados (Kennedy y Marder, 1992). En 1989 Robert Malenka y su grupo, demostraron la importancia de las proteínas cinasas (se caracterizan por transferir un grupo fosfato a sus substratos) en la potenciación a largo plazo. Encontraron que la LTP se bloquea con la administración de inhibidores de la actividad de las proteínas cinasas. Además, de que el mismo bloqueo se obtiene con el uso de inhibidores específicos de las proteínas cinasas dependientes de calcio (trifluoperacina y calmidazolium) (Malenka

et al., 1989). Kennedy y su grupo demostraron el papel central que juega la proteína CaMK-II (Calcio- calmodulina-cinasa-II), mediante la introducción de antagonistas de esta proteína. Sin embargo, el papel explícito que juega CaMK-II en el incremento de la eficiencia sináptica fue descrito en 1997 por Barria y su grupo, al demostrar que su activación se correlaciona con un aumento en los niveles de fosforilación de los receptores AMPA. Con este trabajo fue posible plantear por primera vez, un modelo de los cambios a nivel molecular que tienen lugar durante la inducción de la LTP que permite su mantenimiento, al menos en el mediano plazo.

Se ha demostrado que el mantenimiento de la LTP por períodos prolongados (mayores de una hora) es dependiente de la transcripción de proteínas (Nguyen et al., 1994). Si se bloquea la transcripción de ARN mensajero o la traducción a proteínas, el efecto de la potenciación decae después de una hora. Sin embargo si el bloqueo se realiza después de la inducción a la potenciación, este se mantiene durante la totalidad del registro, sugiriendo que la producción de proteínas, para mantener el aumento de la fortaleza sináptica, ocurre en una determinada ventana de tiempo.

En los últimos años se ha determinado que la entrada de calcio, por intermediación de la proteína calmodulina, causa entre otras cosas, la activación de la glicoproteína adenilato ciclasa; esta proteína produce AMP cíclico a partir de moléculas de ATP (Kennedy y Marder, 1992). Este nucleótido es utilizado como mensajero en un sinnúmero de cascadas de transducción celular. Durante la inducción de la potenciación a largo plazo, el AMP cíclico (cAMP) producido, activa a la proteína cinasa PKA. Huang et al., (1994) mostraron que la LTP decae si la actividad de esta proteína es bloqueada. Al ser activada la proteína PKA ocurre la disociación de su unidad reguladora de la catalizadora, permitiendo la translocación de la segunda al interior del núcleo (Hagiwara et al., 1993). Una vez en el interior transfiere grupos fosfato para la activación de factores de transcripción CREB (Hagiwara et al., 1993) que participa en la modulación de la transcripción de una gran variedad de genes que contienen sitios sensibles a ella, denominado CRE (elemento responsivo al AMPc) (Silva et al., 1998). De hecho a través de la administración de análogos y agonistas del AMPc se ha probado la participación



decisiva de este segundo mensajero tanto en el mantenimiento prolongado de la LTP, como en la consolidación de tareas aversivas (Huang et al., 1994; Roesler et al., 2002; Miranda y McGaugh, 2003). El incremento del AMPc activa rápidamente a los receptores TrkB e induce potenciación a largo plazo dependiente de BDNF en la sinapsis de las colaterales de Schaffer en el hipocampo (Patterson et al., 2001). Algunos estudios han mostrado la importancia de los factores tróficos en la LTP. La expresión de los genes que codifican los factores de crecimiento BDNF y NGF aumenta tras la inducción de LTP (Bramham et al., 1996; Morimoto, 1998). El aumento de la transcripción de genes que codifican factores de crecimiento así como moléculas de adhesión celular podría constituir la relación entre el incremento de la eficiencia sináptica y las modificaciones estructurales de los sitios sinápticos que se han observado tras la inducción de LTP (Edwards, 1995; Finkbeiner et al., 1997) [Fig.4].

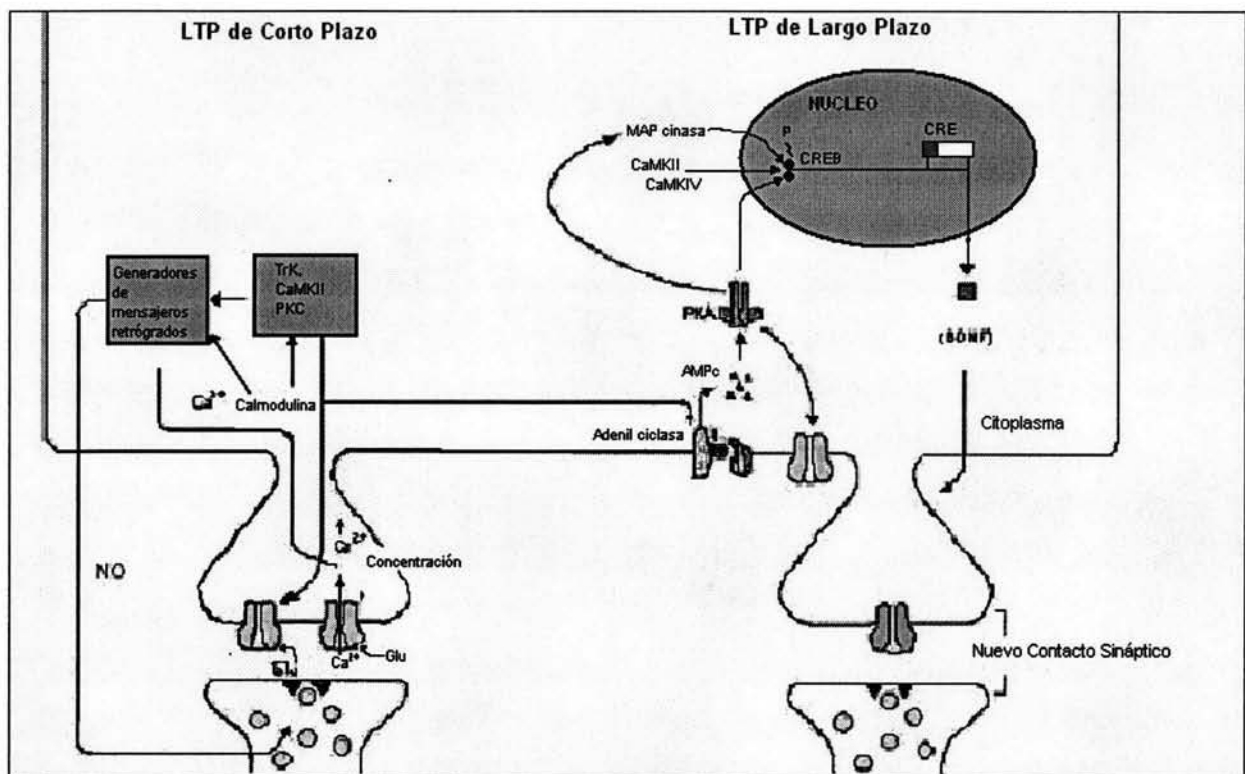


Figura 4. Mecanismos moleculares de la transmisión sináptica tras la inducción de LTP (Kandel, 2001).

### 2.2.3. BDNF y LTP

Evidencias recientes señalan que el BDNF tiene acciones diferentes a las señaladas de manera clásica sobre la diferenciación y la sobrevivencia neuronales. Como por ejemplo la protección ante algunos agentes excitotóxicos, la modulación de la expresión peptídica, etc. En los últimos años, se ha considerado la posibilidad de que las neurotrofinas y en especial el BDNF, se involucren en la regulación de la plasticidad sináptica dependiente de la actividad (Carmignoto et al., 1997). Esto se debe a que se expresan en áreas del cerebro en donde hay una importante manifestación de plasticidad, la actividad regula sus niveles de secreción y estas a su vez regulan tanto la transmisión sináptica como el crecimiento neuronal (McAllister et al., 1999). Esta posibilidad se ve respaldada por numerosos hallazgos, entre los que podemos mencionar, que la expresión de BDNF en la neocorteza visual experimenta un rápido y significativo incremento debido a la actividad neuronal (Bozzi et al., 1995). La inducción de LTP en el giro dentado hipocampal, incrementa los niveles de ARN mensajero para BDNF, NT-3, así como para el receptor TrkB (Bramham et al., 1996; Morimoto et al., 1998). Cepas de ratón carentes del gen que codifica para la expresión de BDNF, exhiben una disminución significativa en la expresión de LTP hipocampal (Korte et al., 1995; Patterson et al., 1996). Aunado a lo anterior, se ha reportado que la adición de BDNF o NT-3 produce incrementos dramáticos de larga duración en la transmisión sináptica (similares a la LTP) en rebanadas o cultivos neuronales hipocampales procedentes de roedores adultos (Levine et al., 1995; Kang y Schuman, 1995).

La investigación en torno a las neurotrofinas endógenas (en especial BDNF y NT-3) en la generación y modulación de la LTP así como la reorganización estructural de las sinapsis, ha experimentado en años recientes un auge considerable (Schuman, 1997; Lu y Chow, 1999; Chen et al., 1999; Minichiello et al., 1999; Aoki et al., 2000; Muller et al., 2000), recientemente se ha demostrado que la infusión de BDNF en un área neocortical como la corteza insular, es capaz de inducir un fenómeno similar a la LTP, en ausencia de estimulación eléctrica de alta frecuencia (Escobar et al., 2003) [Fig. 5].

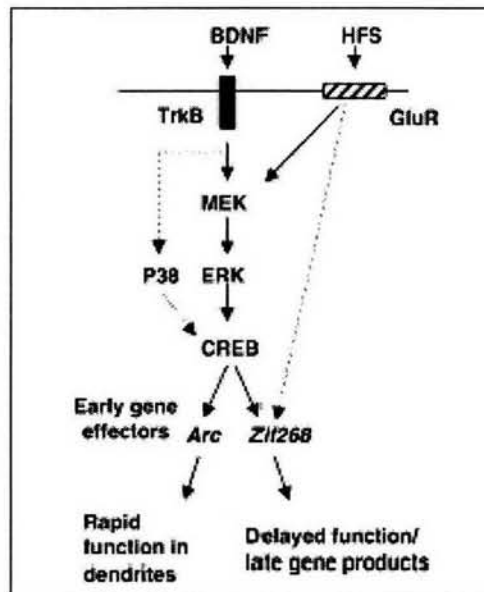


Figura 5. Modelo molecular de la acción del BDNF en la inducción de LTP en el giro dentado del hipocampo, Ying et al., (2002).

Las investigaciones que han utilizado combinaciones de métodos fisiológicos e inmunoquímicos han sido útiles para conocer más de la participación del BDNF en fenómenos como la LTP y sus efectos asociados a la memoria. Por otra parte se ha sugerido que el BDNF tiene un papel instructivo en la conexión sináptica ya que parece disparar procesos involucrados en la estabilidad de la fuerza sináptica (Patterson et al., 2001). Algunos investigadores han señalado una necesaria participación del BDNF durante el mantenimiento de la LTP (Figurov et al, 1996; Patterson et al, 2001). Otros estudios indican que el BDNF modula la transmisión sináptica y la LTP a corto plazo en las vías colaterales de Schaffer (Patterson et al, 1996). La aplicación exógena de BDNF potencia la transmisión sináptica en el hipocampo adulto (Kang y Schuman, 1995). Esta serie de investigaciones sugieren que el BDNF juega un papel importante en la plasticidad a largo plazo en ratas adultas (Schinder y Poo, 2002). Se ha demostrado que los ratones con supresión en

la secuencia de codificación del gen para BDNF tienen una reducción significativa de la LTP en la región CA1 en rebanadas hipocampales (Korte et al., 1995).

Los ratones con un solo alelo funcional para BDNF exhiben una deficiencia en el aprendizaje asociada a la alteración de la respuesta de la LTP (Patterson et al., 1996). También se demostró que las ratas al aprender la tarea espacial del laberinto de agua de Morris muestran un incremento en la transducción de la señal para BDNF y un acoplamiento sináptico de la proteína sinapsina I en el hipocampo (Gómez – Pinilla y Kesslak, 2001). Esto indicaría que el BDNF es importante para la función sináptica durante el aprendizaje en las tareas conductuales (Jankowsky y Patterson, 1999). Por otra parte se ha observado que el incremento en AMPc activa rápidamente a los receptores TrkB e induce LTP dependiente de BDNF en la sinapsis de las colaterales de Schaffer en el hipocampo (Patterson et al., 2001). También se ha observado que el BDNF aumenta la liberación cuantál del neurotransmisor e incrementa el número de vesículas ancladas en la zona activa en el hipocampo (Tyler y Pozzo-Miller., 2001).

### **2.2.3. LTP en la neocorteza**

La LTP fue descrita inicialmente en el hipocampo, y ha sido en esta región del cerebro donde se han registrado la mayoría de los trabajos realizados en el área. Si bien se tiende a considerar a la neocorteza como el lugar que tiene como asiento final la memoria a largo plazo, los trabajos encaminados al estudio de la LTP neocortical han enfrentado una complejidad mayor. Es necesario considerar que en la neocorteza los tipos celulares y las vías aferentes presentan una mayor segregación, lo cual dificulta la interpretación de los registros de campo, así como la inducción de PPSE's (potenciales postsinápticos excitatorios) de una vía aferente bien definida (Bounomano y Merzenich, 1998). Esto ha originado el que una cantidad significativa de estudios apliquen protocolos de inducción de la LTP distintos a los utilizados en el hipocampo. Por ejemplo en la corteza visual de rata y gato parece existir una dependencia entre la edad mínima y la capacidad de inducción de la LTP (Bear y Kirkwood, 1993; Kirkwood et al., 1995), así como la necesidad de ampliar los rangos de frecuencia y el número de estimulaciones tetánicas, por ejemplo, si en el

hipocampo basta con la aplicación de 10 a 400 Hz por tiempos de 0.2 a 10 segundos para robustecer la respuesta sináptica. En la neocorteza se han empleado tiempos de hasta una hora con frecuencias tan bajas como 2 Hz; en numerosos casos ha sido necesario también el uso de bicuculina para inhibir la acción GABAérgica, el principal sistema inhibitorio de la neocorteza (Tsumoto, 1992; Bear y Kirkwood, 1993). No obstante, la presencia de LTP en la corteza es un hecho comprobado y cada día se incrementa el número de regiones en las que ha sido posible inducirla, como la corteza visual primaria del gato (Komatsu et al., 1988, 1988) y rata (Artola y Singer, 1990; Akaneya et al., 1997, Carmignoto et al., 1997; Ying et al., 2002), la corteza somatosensorial en gato (Lee et al., 1991), la corteza prefrontal en rata (Hirsch y Crepel, 1990), la corteza somatosensorial y motora de rata (Rioult-Pedotti et al., 2000) y recientemente en la corteza insular (Escobar et al., 1998a). Con lo expuesto anteriormente la LTP es un candidato como mecanismo que media la plasticidad cortical.

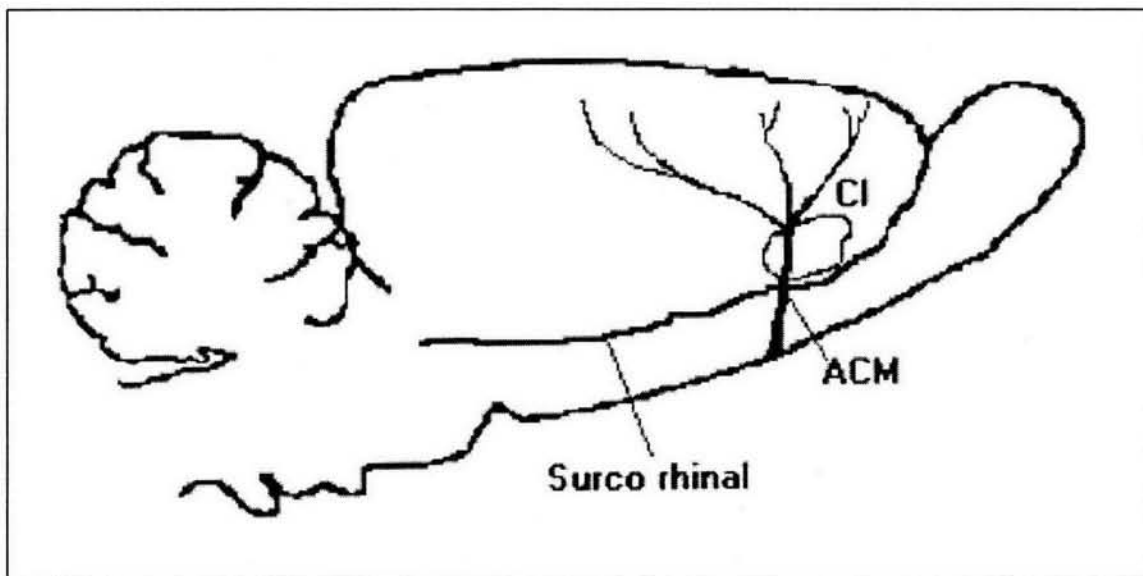
### **2.3. La Corteza Insular**

#### **2.3.1. Características fisiológicas y anatómicas**

La corteza insular, es un área neocortical ubicada en las regiones 13 y 14 de Krieg en el lóbulo temporal. A partir de sus características citoarquitectónicas se pueden distinguir tres zonas en su estructura: agranular, disgranular y granular, dependiendo de la menor o mayor presencia de neuronas granulares (capa cortical IV). La corteza insular en ratas comprende un área de aproximadamente 3 mm x 1 mm que corre por encima y a lo largo del surco rhinal, alrededor de la arteria cerebral media (Braun et al; 1982) [Fig 6]. Se extiende dorsalmente hacia los bordes de las áreas somatosensoriales primaria y secundaria, posee una región anterior que es principalmente agranular y una región posterior con dos subregiones denominadas disgranular y granular. La corteza insular agranular se fusiona imperceptiblemente con la corteza perirhinal (Paxinos y Watson, 1995). Estudios electrofisiológicos mediante estimulación y evocación de señales de la lengua a la corteza gustativa, sugieren que en ratas los estímulos gustativos están confinados a la región agranular, aunque en primates se ha observado mayor correspondencia en la región



granular y disgranular (Travers, 1993). Su interés no es sólo por su participación en el procesamiento de estímulos gustativos (Braun et al., 1982, Lasiter et al., 1982; Kiefer, 1985), sino porque diversos estudios han demostrado su participación en diversas tareas de aprendizaje, principalmente aquellas relacionadas con situaciones motivadas aversivamente (Dunn y Everitt, 1988; Escobar et al; 1989; Bermúdez-Rattoni y McGaugh, 1991). Utilizando lesiones químicas en la corteza insular, se produce un severo déficit en el aprendizaje de la prevención pasiva, evidenciando un decremento significativo en la entrada al campo oscuro y un incremento en la estancia dentro de éste (Bermúdez-Rattoni y McGaugh, 1991). Con lesiones reversibles de la corteza insular, utilizando tetrodotoxina, la cual bloquea los canales de sodio, se observó que la ejecución en el laberinto de agua de Morris se ve afectada (Bermúdez-Rattoni y McGaugh, 1991; Bermúdez-Rattoni et al., 1997).



**Figura 6.** Esquema que muestra la ubicación de la corteza insular. CI corteza insular; ACM, arteria cerebral media.

### 2.3.2. Aferencias gustativas a la corteza insular

En la actualidad se cuenta con información precisa que describe cual es el recorrido anatómico que siguen los estímulos gustativos de la periferia hacia la neocorteza, basándose en estudios anatómicos, electrofisiológicos y conductuales.

Inicialmente cuando un sabor es detectado por los receptores gustativos de la boca y transmitido hacia la porción anterior del núcleo del tracto solitario (NTS) en el tallo cerebral, vía los nervios craneales facial (VII) y glosofaríngeo (IX) principalmente y de manera secundaria por el vago (X). El segundo relevo del estímulo gustativo se ubica en el núcleo parabraqueal del puente, en lo que se ha denominado área gustativa del puente (PTA por sus siglas en inglés). Una vez aquí se reconocen dos rutas a seguir: en su mayoría las aferencias del PTA se dirigen a estructuras ventrales del cerebro basal, como son la amígdala, la zona lateral del hipotálamo y la sustancia innominata. La segunda ruta se dirige al complejo ventrobasal del tálamo, el cual se comunica con la corteza insular (Travers, 1993). Lasiter et al. (1982) describen mediante el complejo de peroxidasa de rábano la existencia de proyecciones directas entre el PTA y la neocorteza, a las que les adjudican una función de discriminación fina de sabores. Es importante destacar que el primer relevo en este circuito (el NTS) recibe señales muy importantes provenientes de la rama hepática del vago así como señales del área postrema y del sistema vestibular [Fig. 7]. Estas señales proveen información relacionada con irritación por intoxicación estomacal, sanguínea y sensaciones de náusea, respectivamente, las cuales llegan a la corteza insular, por lo cual se le ha denominado corteza visceral. Además se debe de considerar la conectividad recíproca y funcional de la CI con la amígdala, estructura cerebral vinculada estrechamente con la memoria aversiva (McGaugh et al; 1990; LeDoux, 1993), en particular con las proyecciones que recibe directamente del núcleo basolateral amigdalino (Krettek y Price, 1974; Escobar et al., 1989; Bermúdez-Rattoni y McGaugh., 1991). A partir de su conectividad ha sido posible considerar a la CI como una estructura fundamental en los procesamientos de integración y almacenamiento de información gustativo-visceral, capaz de dirigir conductas motivadas por este tipo de información, como la evitación o aceptación de un alimento dependiente de una experiencia gustativa previa (Kiefer, 1985; Bermúdez-Rattoni y McGaugh, 1991).

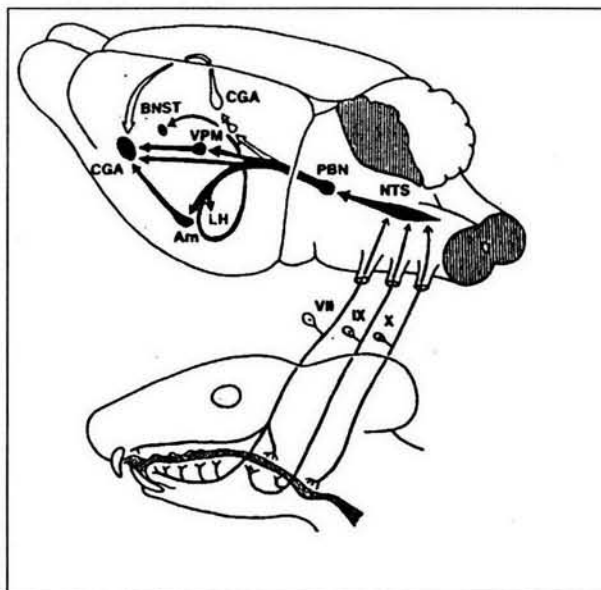


Figura 7. Esquema de las vía aferente gustativa en la rata, abreviaturas: VII, nervio facial; IX, nervio glasofaríngeo; X, nervio vago; NTS, núcleo del tracto solitario; PBN, núcleo parabrancial del puente; VPM, núcleo posteromedial ventral del tálamo; CGA, área gustativa cortical insular; BNST, núcleo rojo de la stria terminalis, LH, hipotálamo lateral; Am amígdala. Modificado de Yamamoto (1998).

### 2.3.3. Condicionamiento aversivo a los sabores

El condicionamiento aversivo a los sabores (CAS) es un paradigma de aprendizaje ampliamente utilizado para el estudio de los procesos de aprendizaje y memoria. En este modelo conductual un animal adquiere aversión ante un estímulo gustativo novedoso cuando éste se asocia con una irritación gástrica. El condicionamiento aversivo a los sabores fue originalmente descrito por García et al., (1955), quien encontró que si se colocaba un bebedero de agua con la punta de plástico en el interior de una cámara de radiación, el animal no volvería a beber en un bebedero con esa clase de punta aun afuera de la cámara de radiación. Para García este era un claro ejemplo de aprendizaje, en el que el animal relacionaba el sabor con algún efecto de malestar. Más tarde surgió un paradigma que se obtuvo con el apareamiento del sabor y un estímulo que produjera irritación gástrica como el cloruro de litio (LiCl) (García y Koellin, 1966), fue entonces cuando a este paradigma



se le llamó condicionamiento aversivo a los sabores. Tras el descubrimiento del CAS se comenzaron a estudiar los mecanismos cerebrales de los procesos de aprendizaje gustativo. Los resultados fueron múltiples, sin embargo el más sobresaliente fue en 1972 cuando se reportó que la región cortical conocida en ese entonces como corteza gustativa estaba involucrada en el CAS, en vista de que las lesiones en esta región producían considerables déficit en el aprendizaje de la evitación al sabor (McGowan et al., 1972; Bermúdez-Rattoni y McGaugh, 1998).

Todos los seres vivos tienen la necesidad de obtener las sustancias que les aseguren un aporte adecuado de energía para la realización de sus actividades diarias. Estas sustancias son obtenidas mediante la ingestión de comida y las subsecuentes transformaciones metabólicas de dicho alimento en el cuerpo. Para que el organismo sea capaz de obtener los nutrientes que requiere es necesario que desarrolle conductas que incluyen el reconocimiento de necesidades corporales ante un bajo nivel de energía o la necesidad de alguna sustancia en particular (sensación de hambre), identificar si la sustancia ingerida es capaz de cubrir sus necesidades energéticas con el fin de encontrar y consumir las cantidades adecuadas, y por último, regular los procesos que llevan a cabo la ingesta de alimentos. Por lo anterior, resulta clara la importancia evolutiva que ha tenido el desarrollo de mecanismos neuronales sumamente especializados capaces de controlar de modo eficiente la ingesta de los alimentos y las consecuencias de éstos para cada organismo (Bures et al., 1998). Es indispensable que cada ser vivo aprenda y recuerde aquello que lo nutre o lo enferma. Hasta la fecha se conoce que existe una estrecha asociación entre los estímulos viscerales y los estímulos externos, es normal que cuando un estímulo externo es asociado a una sensación de malestar físico la respuesta adecuada sea evitar ese estímulo.

Entre las similitudes que presenta el CAS con respecto al condicionamiento es posible mencionar su tendencia a generalizar (la aversión de un sabor se extiende a alimentos o sustancias con sabores similares), presenta un periodo de extinción, es decir, un debilitamiento de la respuesta condicionada ya establecida (con la particularidad de que en el CAS la extinción es resistente), y que el condicionamiento

es muy fuerte cuando el estímulo condicionado es novedoso. Cuando por experiencias previas el organismo reconoce un estímulo condicionado como seguro, el desarrollo de la respuesta condicionada ante este estímulo se ve retardado, este fenómeno se conoce como inhibición latente. En el caso del CAS una de las características más importantes es su selectividad a los estímulos gustativos, es decir, un solo entrenamiento basta para obtener una fuerte respuesta aversiva ante un sabor novedoso (Bernstein, 1991).

Por otra parte en el CAS existe la peculiaridad de que la asociación entre el estímulo condicionado y el estímulo incondicionado está mediada por tiempos bastante amplios desde minutos hasta horas. Bures (1998) postula la formación de la memoria gustativa a corto plazo al ser presentado el EC. La memoria gustativa a corto plazo requiere de la participación de la neocorteza donde puede asociarse finalmente el EI y formar la memoria gustativa a largo plazo. Se considera que la formación de la memoria gustativa a corto plazo es lenta, alcanza su máximo entre los primeros 10 a 60 minutos después de la percepción del EC y decae entre las 8 a 12 horas. Este mecanismo puede corresponder al tiempo que tarda el sistema digestivo en transportar y detectar los efectos de las sustancias tóxicas que se hubiesen ingerido (Bures, 1998).

#### **2.3.4. Corteza insular y CAS**

Debido a su función integradora de estímulos gustativos y viscerales, los primeros estudios referentes a la memoria en la corteza insular se realizaron con el condicionamiento aversivo a los sabores (CAS). De forma natural cualquier animal evita volver a ingerir un alimento que le haya provocado algún malestar gástrico con anterioridad, el individuo asocia el sabor de ese alimento con un malestar y aprende a no ingerir nada que posea ese sabor. En el CAS se asocia una irritación gástrica provocada por ejemplo con cloruro de litio (LiCl), a un sabor determinado de manera que cuando el animal prueba nuevamente ese sabor presenta una respuesta de rechazo al asociarlo con el malestar.

Los sustratos anatómicos utilizados en el aprendizaje del CAS han sido bien establecidos (Kiefer, 1985; Braun et al., 1982). En este sentido se ha demostrado que las lesiones bilaterales de la CI afectan la adquisición y retención del CAS (Yamamoto et al., 1980; Brown et al., 1982). Debido a que las lesiones de la CI no producen deficiencias en la capacidad gustativa o gastrointestinal, se ha sugerido que la corteza insular afecta la representación mnémica de los sabores y sus respuestas gastrointestinales (Kiefer, 1985). En estudios similares se ha observado que al combinar lesiones bilaterales de la CI con lesiones en la amígdala la respuesta del CAS se agudiza (Yamamoto et al 1995), lo que resalta la estrecha conectividad entre la CI y la amígdala para la adquisición y recuerdo de esta tarea.

### **2.3.5. La amígdala y el CAS**

Swanson y Petrovich (1998) señalan que la amígdala en el cerebro de rata puede dividirse en 4 grupos: 1) núcleo central, 2) núcleo medial, 3) núcleo cortical y núcleo basomedial y 4) núcleo lateral y núcleo basolateral. La amígdala ha sido relacionada frecuentemente con las funciones emotivas mas que con las cognitivas (LeDoux, 1993). Se ha observado que la estimulación de diferentes áreas de la amígdala se vincula a cambios en el sistema nervioso autónomo, en particular en cambios asociados con la expresión de miedo y ansiedad (Davis, 1994). Reacciones como el incremento en la presión sanguínea, dilatación pupilar y la salivación son mediadas por las proyecciones del núcleo central de la amígdala. Se ha considerado a la amígdala como un enlace entre estímulos y recompensas (Gaffan, 1992), como la base neuroanatómica de los cambios neuronales que subyacen a la memoria afectiva (Davis, 1992) o bien, como una estructura capaz de regular el almacenamiento de información en otras áreas cerebrales, siempre que sea activada por un estímulo emocional. Esto es, la amígdala es capaz de fortalecer las memorias al relacionarlas con un significado emocional (McGaugh et al., 1990). Las lesiones en la amígdala han sido asociadas con efectos adversos en la realización de pruebas de aprendizaje como la prevención pasiva (McGaugh et al., 1995), la potenciación del reflejo al miedo (Falls et al., 1992) y la prevención activa (Bermúdez-Rattoni et al., 1997). La evidencia experimental ha logrado establecer un estrecho vínculo entre

la amígdala y su participación en el CAS. Richardson (1973) observó que la estimulación de los núcleos basolateral o corticomediales de la amígdala produce inhibición en el consumo de alimentos. Lasiter (1982) demostró la presencia de proyecciones amígdalocorticales entre la neocorteza gustativa y los núcleos lateral y basolateral de la amígdala. En la actualidad es bien conocido que la amígdala recibe proyecciones directas del núcleo basolateral amigdalino (Bla) y que ambas estructuras contribuyen decisivamente a la formación y retención de la memoria asociada a sabores (Bermúdez-Rattoni et al., 1997; Bermúdez-Rattoni y McGaugh, 1991). Asimismo, se ha observado que al lesionar el Bla se altera la respuesta de aversión al sabor, mientras que las lesiones en el núcleo central de la amígdala no producen un efecto similar (Yamamoto et al., 1995). Esto sugiere una participación decisiva de la Bla en el CAS, lo cual se sustenta aún más si consideramos la interconectividad recíproca y funcional existente entre este núcleo y la CI (Escobar et al., 1989).

#### **2.4. BDNF, LTP y CAS**

En la actualidad, se tiene un conocimiento claro de las aferencias que recibe la CI, siendo de particular interés las provenientes del núcleo basolateral amigdalino (Bla) (Krettek y Price, 1974; Escobar et al., 1989; Bermúdez-Rattoni y McGaugh; 1991; Bermúdez-Rattoni et al., 1997). Por otra parte, la inducción de la LTP en la amígdala se encuentra bien documentada y existe una clara caracterización del circuito sináptico que participa durante el condicionamiento al miedo en el que se involucra la participación de la amígdala (Maren, 1996; Rogan et al., 1997; Huang et al., 2000).

La CI y la amígdala contribuyen a la formación y la retención de la memoria asociada al malestar gástrico (Bermúdez-Rattoni y McGaugh, 1991; Bermúdez-Rattoni et al., 1997). Recientemente, Escobar et al., (1998b) lograron inducir LTP *in vivo* en la CI mediante la estimulación de alta frecuencia de las aferencias provenientes del Bla, el incremento en la respuesta sináptica de esta vía se conserva en un periodo de por lo menos una hora y su inducción puede ser bloqueada por la aplicación de antagonistas a los receptores glutamatérgicos de tipo NMDA como el

CPP y el MK-801. Resultados similares fueron hallados por Jones et al., (1999). Estos resultados son de particular interés debido a que demuestran que las modificaciones en la eficiencia sináptica dependientes de la actividad, están presentes en la corteza insular, sugiriendo que la LTP de la vía Bla-CI constituye un posible mecanismo para las funciones mnémicas realizadas por la corteza insular. Recientes investigaciones demuestran que la inducción de LTP en la proyección (Bla-CI) previa al entrenamiento del CAS, aumenta la retención de esta tarea (Escobar et al., 2000), por otra parte el BDNF es capaz de inducir por sí solo LTP en la corteza insular, en ausencia de estimulación de alta frecuencia (Escobar et al., 2003). Lo anterior indica la posible participación del BDNF en las funciones mnémicas ejecutadas por esta región neocortical. En virtud de que el BDNF se encuentra ampliamente involucrado en la modulación de ambas expresiones de plasticidad sináptica, y puesto que las cascadas metabólicas que se desencadenan tras su interacción con el receptor TrkB convergen en la modulación de la transcripción génica descrita, resulta posible su participación en los procesos de aprendizaje y memoria (McAllister et al., 1999; Tyler et al., 2002; Yamada et al., 2002). De hecho entre los patrones de señalización involucrados en la influencia que el BDNF ejerce sobre los procesos de aprendizaje y memoria, destaca el patrón de señalización dependiente de MAPK a través de la activación de ERK (extracellular signal-regulated kinase) para incrementar la transmisión sináptica excitatoria *in vivo*, así como en algunas tareas de aprendizaje que involucran la integridad hipocámpal (Messaoudi et al., 2002; Tyler et al., 2002; Ying et al., 2002). Investigaciones realizadas por Jones y colaboradores en 1999, señalan que la LTP neocortical origina la activación de ERK. De esta manera, la convergencia entre los patrones de señalización activados por BDNF/TrkB y por la estimulación capaz de inducir LTP, coadyuva a la comprensión de los mecanismos celulares que subyacen a los cambios en la eficiencia sináptica implicados en los procesos de aprendizaje y memoria.



### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

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

En estudios previos se demostró que la estimulación tetánica de la amígdala basolateral induce LTP en la corteza insular de las ratas adultas (Escobar et al, 1998a). Se observó asimismo que la administración intracortical de antagonistas de los receptores (NMDA), deteriora la adquisición del CAS y bloquea la inducción de la LTP en este patrón de comunicación (Escobar, et al 1998b). Se demostró también que la inducción de LTP en la proyección de la amígdala basolateral a la corteza insular, previa al entrenamiento del condicionamiento aversivo a los sabores aumenta la retención de esta tarea (Escobar et al., 2000). En una investigación reciente se ha mostrado que la administración intracortical de BDNF a la corteza insular, produce un incremento en la eficiencia sináptica en el patrón de comunicación del Bla-CI, similar al obtenido tras la estimulación tetánica capaz de inducir LTP en esta área (Escobar et al., 2003). Considerando que el BDNF es capaz de inducir un fenómeno similar a la LTP y que la inducción de LTP produce un incremento en la retención del CAS, la presente investigación tuvo el objetivo de examinar los efectos de la administración intracortical del BDNF en la corteza insular sobre el condicionamiento aversivo a los sabores.

#### 4. OBJETIVOS

- Explorar los efectos que tiene el BDNF (en concentraciones capaces de inducir LTP en ausencia de estimulación tetánica) sobre la extinción del condicionamiento aversivo a los sabores, determinando la posible participación de esta neurotrofina en la retención de la citada tarea.
- Caracterizar parte de los mecanismos involucrados en las acciones del BDNF sobre el condicionamiento aversivo a los sabores, empleando un inhibidor de los receptores Trk, denominado K252a.

#### 5. METODOLOGÍA

**Sujetos.**- Para la presente investigación se prepararon 36 ratas macho de la cepa Wistar con pesos de 350-380g, que se mantuvieron en cajas individuales de policarbonato. Las ratas estuvieron bajo un ciclo de luz - oscuridad 12h/12h a una temperatura promedio de 21°C, con comida y agua *ad libitum* (excepto en las fases experimentales que especifiquen lo contrario).

**Implantación de cánulas.**- El procesamiento quirúrgico de los sujetos se llevó a cabo utilizando procedimientos estereotáxicos convencionales y consistió en la implantación bilateral de guías cánulas de acero inoxidable de 1 cm. De largo y 0.022 pulgadas de calibre, bajo el efecto de anestesia Pentobarbital (Nembutal) 50 mg/kg; vía intraperitoneal). Las coordenadas empleadas fueron AP=+1.2 mm; ML=±5.0 mm; DV=-2 mm (Paxinos et al., 1995). Los extremos de las guías cánula fueron colocadas 5 mm arriba de la CI bilateralmente; fueron fijadas al cráneo usando acrílico dental de secado rápido [Figura 8]. Un estilete de alambre de acero inoxidable se colocó en el interior de las cánulas con el fin de proteger su luz de obstrucciones con material orgánico durante el periodo de entrenamiento.

Los grupos canulados fueron infundidos intraparenquimalmente en la región correspondiente a la CI (bilateralmente). Para todos los grupos, las microinyecciones

fueron administradas por microinyectores consistentes en agujas dentales de calibre 30. El microinyector fue introducido en la cánula previa remoción del estilete y se extendió 3 mm por debajo del extremo inferior de la cánula, alcanzando así la región correspondiente a la CI bilateralmente. Los microinyectores fueron conectados mediante tubos de polietileno a jeringas Hamilton de 10  $\mu$ l. Las microinyecciones fueron dosificadas mediante una bomba de microinfusión (Carnegie Medicin, MA) a una velocidad de flujo de 1  $\mu$ l / minuto. Una vez inyectado el volumen total de la solución vehículo con o sin fármaco, de acuerdo al protocolo experimental los microinyectores permanecieron durante un minuto más para asegurar la adecuada difusión de la solución en el tejido [Fig. 8].

### IMPLANTACIÓN DE CÁNULAS EN LA CORTEZA INSULAR

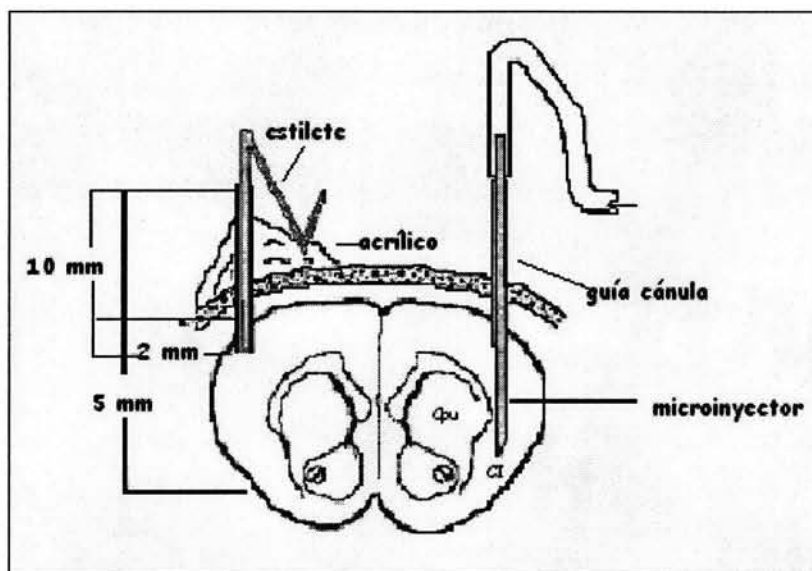


Figura 8. Esquema en un corte coronal de la posición de las guías cánula utilizadas para la infusión de los fármacos dentro de la corteza insular. CI= corteza insular, Cpu= caudado-putamen.

Los animales fueron divididos en los siguientes grupos experimentales: grupo PBS (n=7) al que se le administró amortiguador de fosfatos como vehículo (0.1 M, pH 7.4) (PBS; 3 $\mu$ l bilateralmente) durante 3 min; grupo BDNF (n=9) al que se



administró la neurotrofina (BDNF 3 $\mu$ g/3 $\mu$ l bilateralmente), (Alomone Labs. Jerusalém) durante 3 min; grupo CYT- C (n=6), al que se administró citocromo-C, (CYT-C 3 $\mu$ g/3 $\mu$ l bilaterlamente), (Sigma, St. Louis, MO) durante 3 min, como control protéico; grupo BDNF+K252a (n=7), al que se administró una combinación de BDNF+K252a (un inhibidor de los receptores Trk) (3 $\mu$ g/3 $\mu$ l bilateralmente), durante 3 min y grupo CON (n=7) el cual permaneció intacto sin la administración de ningún fármaco y sin la operación estereotáxica convencional. La concentración de cada fármaco se basó en estudios previos (Messoudi et al., 1998; Jiang et al., 2001; Escobar et al., 2003).

**Condicionamiento aversivo a los sabores.-** Tras una semana de recuperación post-cirugía se procedió a administrar los fármacos, 24 horas previas al inicio del entrenamiento del CAS. Para iniciar el CAS los animales fueron privados de agua por 24 horas. Se les entrenó para beber agua dos veces al día (10:00 y 18:00 hrs.) durante 10 minutos por cada sesión de entrenamiento en un periodo de cuatro días durante los cuales se estableció la línea base de consumo. Los bebederos fueron contruidos con probetas graduadas cubiertas con tapones de caucho horadados con boquillas de metal. El día de la adquisición los animales fueron privados de alimento sustituyendo el agua por un sabor novedoso (solución de sacarina al 0.1%; Sigma, WI), 10 minutos después los animales recibieron una dosis intraperitoneal de cloruro de litio (0.2 M; 9.37 ml/Kg) para inducir el malestar digestivo. El consumo de la línea base fue restablecido por cuatro días más. Durante las pruebas de aversión el agua fue sustituida nuevamente por la solución de sacarina 0.1%. La disminución del consumo de sacarina con respecto a la ingesta de agua durante la línea base fue usada como parámetro comparativo de la fuerza aversiva del CAS. Para determinar la posible participación del BDNF en la retención del condicionamiento aversivo a los sabores, se llevaron a cabo nueve sesiones de extinción para todos los grupos [Fig. 9].

## ESQUEMA DEL CONDICIONAMIENTO AVERSIVO A LOS SABORES

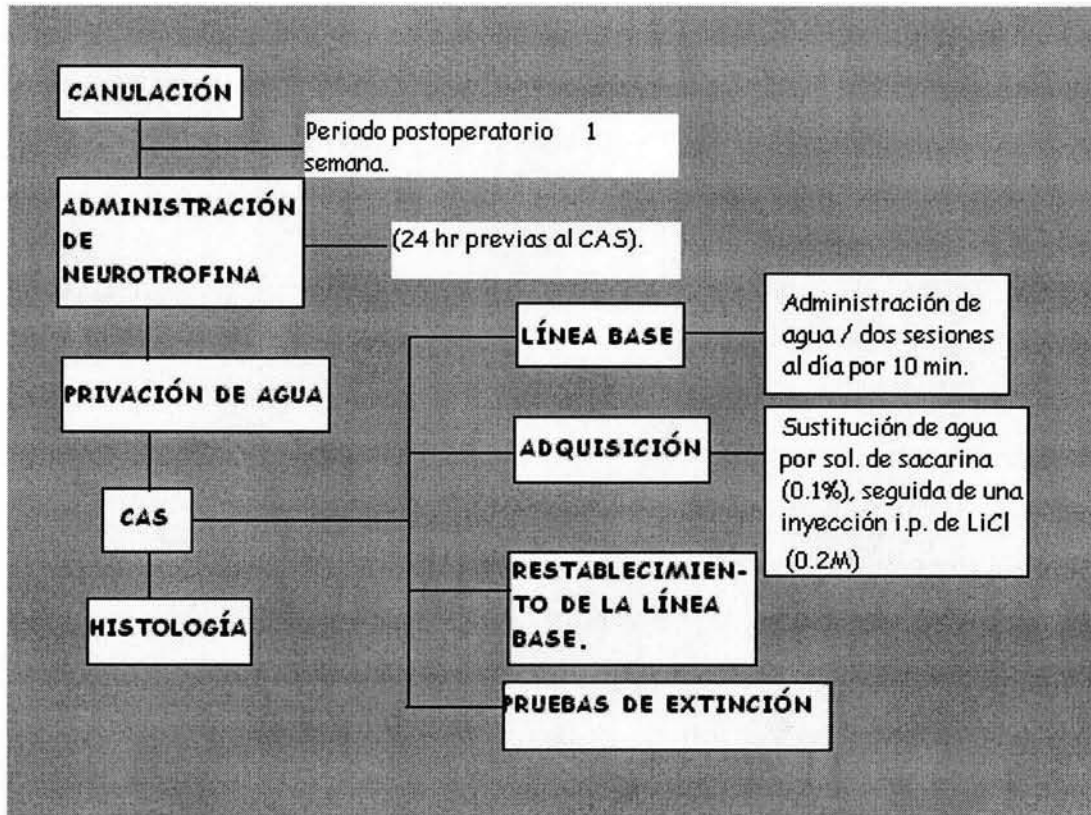


Figura 9. Diagrama de flujo del condicionamiento aversivo a los sabores (CAS).

**Histoquímica de Nissl.**- Una vez concluida la fase conductual del experimento, los animales fueron sacrificados mediante una sobredosis del anestésico pentobarbital. Se procedió a la perfusión intracardial de los sujetos canulados con solución salina al 0.9% seguida por una segunda perfusión con solución fijadora de paraformaldeído 4% / glutaraldeído 0.1% en PBS pH 7.4. Los cerebros fueron extraídos y almacenados para su postfijación en paraformaldeído 4% / glutaraldeído 0.1% durante 24 horas a 4°C. Transcurrido este periodo, fueron almacenados en una solución de sacarosa al 30% en PBS hasta que alcanzaron una densidad mayor a la

de la solución. Solo entonces los cerebros fueron congelados y rebanados en cortes coronales de 40  $\mu\text{m}$ . Los cortes se montaron en portaobjetos de cristal bañados de gelatina y cromoalúmina.

Las muestras fueron teñidas con violeta de cresilo y examinadas en un microscopio de luz, con el fin de verificar la posición de la punta del microinyector.

**Análisis de datos.**- Para el análisis del curso temporal de la curva de extinción, se empleó el ANOVA de medidas repetidas, mientras que para el análisis de cada sesión de extinción, se efectuó el ANOVA factorial. En ambos casos se utilizó la prueba post-hoc de Fisher.

## RESULTADOS

**Histología:** La figura 10 es una muestra representativa de la adecuada posición de los microinyectores en la corteza insular, cabe mencionar que los animales con cánulas que no presentaron una posición adecuada fueron excluidos del análisis experimental, los registros histológicos fueron efectuados según el procedimiento mencionado en la metodología.

### REGISTROS HISTOLÓGICOS

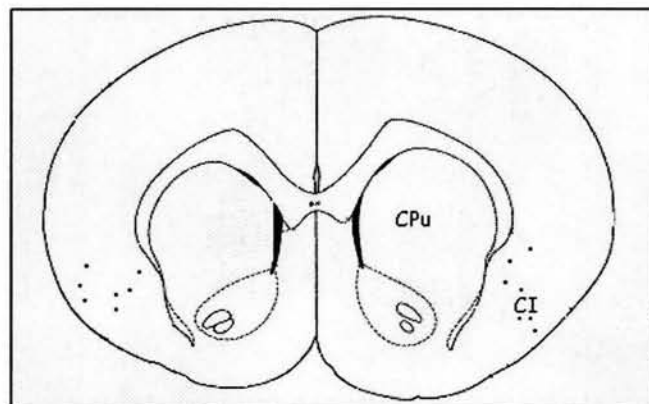


Figura 10. Diagrama de los registros histológicos. Los puntos señalan la posición de la punta de los microinyectores en la corteza insular. CI: corteza insular, CPu: caudado putamen.

## **Análisis de datos:**

### **Línea base y adquisición**

No existieron diferencias significativas entre los cinco grupos durante el consumo basal de agua (línea base) ni durante el consumo de la solución de sacarina durante la sesión de adquisición del CAS, [Gráfica 1].

### **Pruebas de extinción**

Por el contrario, se observaron diferencias significativas entre los grupos durante la retención de la prueba, como se aprecia en la gráfica 2 durante las sesiones de extinción. El ANOVA de medidas repetidas reveló diferencias significativas entre los grupos  $F_{(4,31)} = 31.55$ ,  $p < 0.0001$ . Después de que el ANOVA reveló diferencias significativas se emplearon las pruebas Fisher con el fin de realizar comparaciones específicas. El análisis post-hoc empleando la prueba de Fisher mostró que el grupo BDNF presentó un incremento significativo en la retención de la tarea, como lo refleja el decremento en el consumo de sacarina, cuando se compara con los grupos restantes durante las tercera, cuarta, quinta, sexta ( $p < 0.0001$ ) y séptima sesiones de extinción ( $p < 0.05$ ).

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

En la primera sesión de extinción puede apreciarse que el grupo BDNF+K252a presenta diferencias significativas ( $*p < 0.05$ ) con los grupos CYT-C y BDNF (ver gráfica 3).

En la segunda sesión de extinción se observa que existen diferencias significativas ( $**p < 0.0001$ ) entre el grupo BDNF+K252a con respecto a los demás grupos (ver gráfica 4). El comportamiento mostrado por el grupo BDNF+K252a durante las dos primeras sesiones, podría implicar la influencia del bloqueador de los receptores Trk sobre las acciones de la neurotrofina endógena del sistema.

En la tercer sesión de extinción se puede apreciar una diferencia altamente significativa ( $**p < 0.0001$ ) en el consumo de la solución de sacarina entre el grupo BDNF con respecto a los demás grupos (ver gráfica 5).

Hacia la cuarta sesión de extinción se puede observar que existe una diferencia nuevamente altamente significativa ( $**p < 0.0001$ ) entre el grupo BDNF con los grupos restantes (ver gráfica 6).

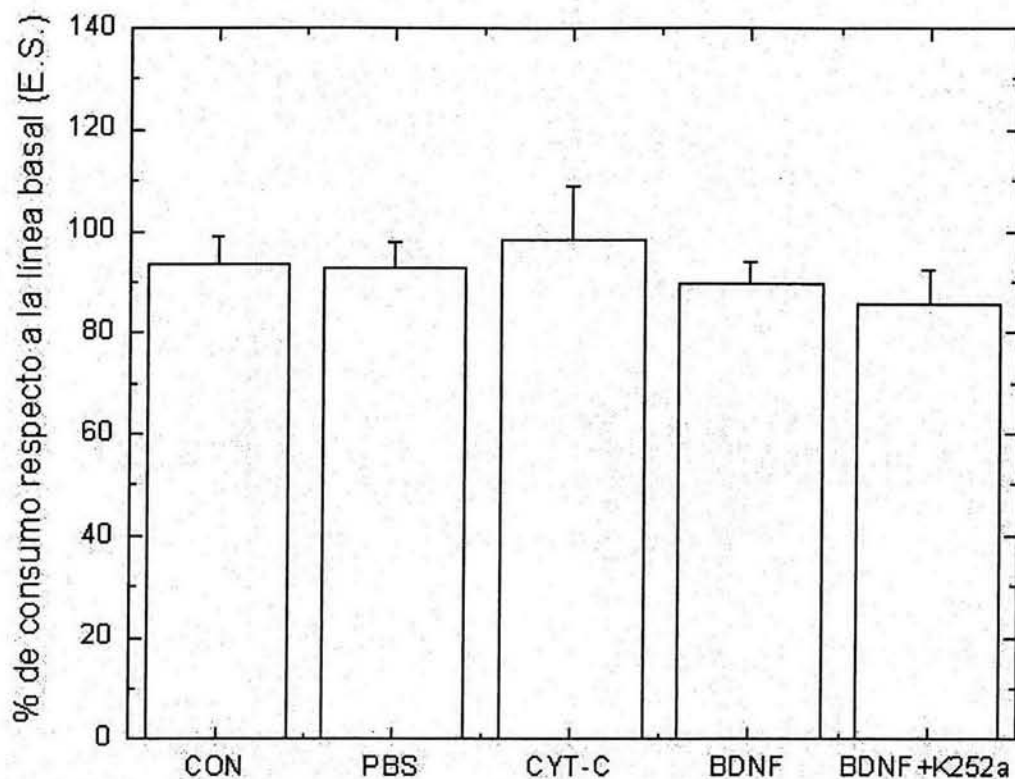
Por su parte, durante la quinta sesión de extinción se observa una diferencia altamente significativa ( $**p < 0.0001$ ) entre el grupo BDNF con respecto a los demás grupos, mientras que los grupos CON, CYT-C, PBS y BDNF+K252a han alcanzado su nivel basal (ver gráfica 7).

En la sexta sesión de extinción se puede apreciar nuevamente una diferencia altamente significativa en el consumo porcentual de la solución de sacarina ( $**p < 0.0001$ ) entre el grupo BDNF con respecto a los grupos CON, CYT-C, PBS y BDNF+K252a (ver gráfica 8).

Durante la séptima sesión de extinción existe una diferencia significativa de ( $*p < 0.05$ ) entre el grupo BDNF con respecto a los grupos restantes (ver gráfica 9).

Finalmente hacia la octava y novena sesiones de extinción no se revelan diferencias significativas de los grupos entre sí (ver gráficas 10 y 11).

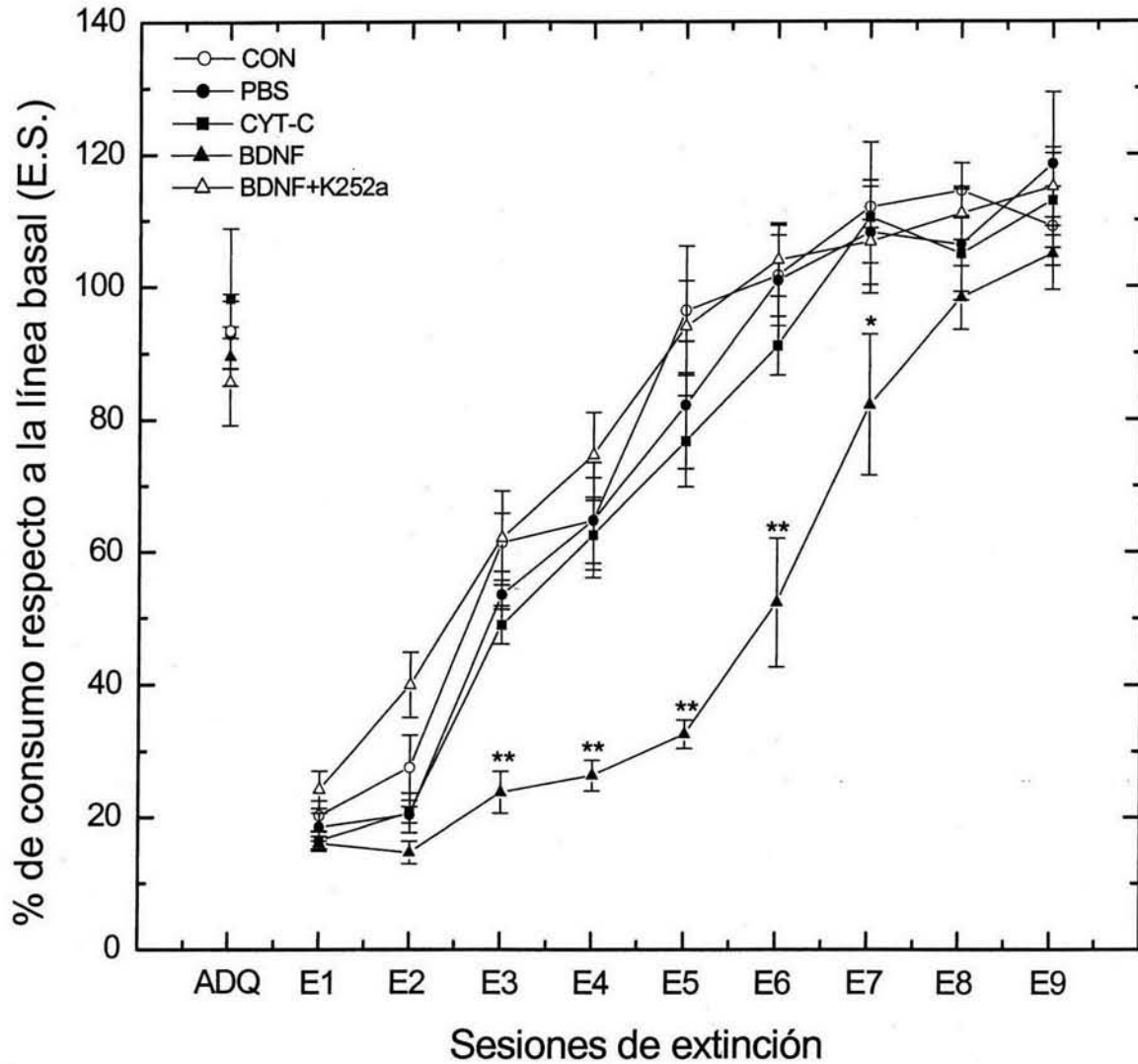
### Consumo de la solución de sacarina durante la sesión de adquisición (ADQ)



Gráfica 1. Consumo de la solución de sacarina durante la sesión de adquisición. No se observaron diferencias significativas entre los porcentajes de consumo respecto a la línea base de los cinco grupos. CON = grupo control (n=7), PBS = grupo control vehículo PBS (n=7), CYT-C = grupo control vehículo CYT-C (n=6), BDNF+K252a = grupo con la combinación de BDNF y el antagonista K252a (n=7), BDNF = grupo tratado con BDNF (n=9).

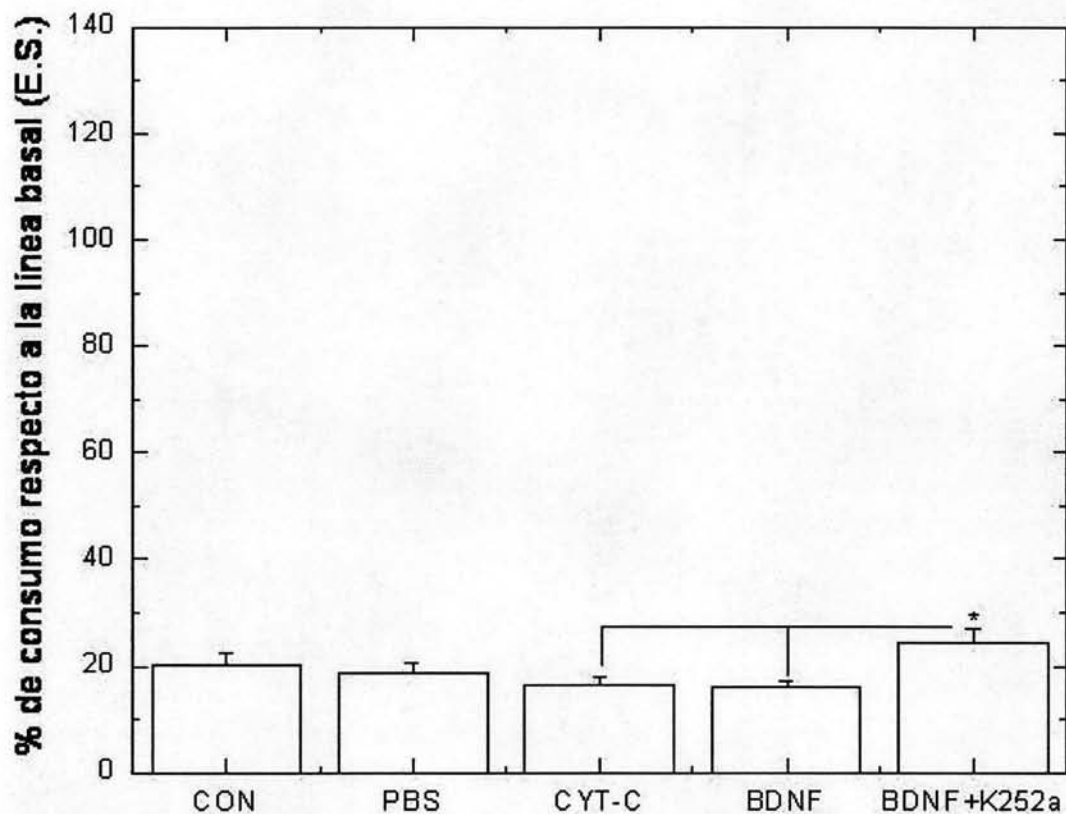


**Consumo de la solución de sacarina durante la adquisición y nueve sesiones de extinción en el CAS.**



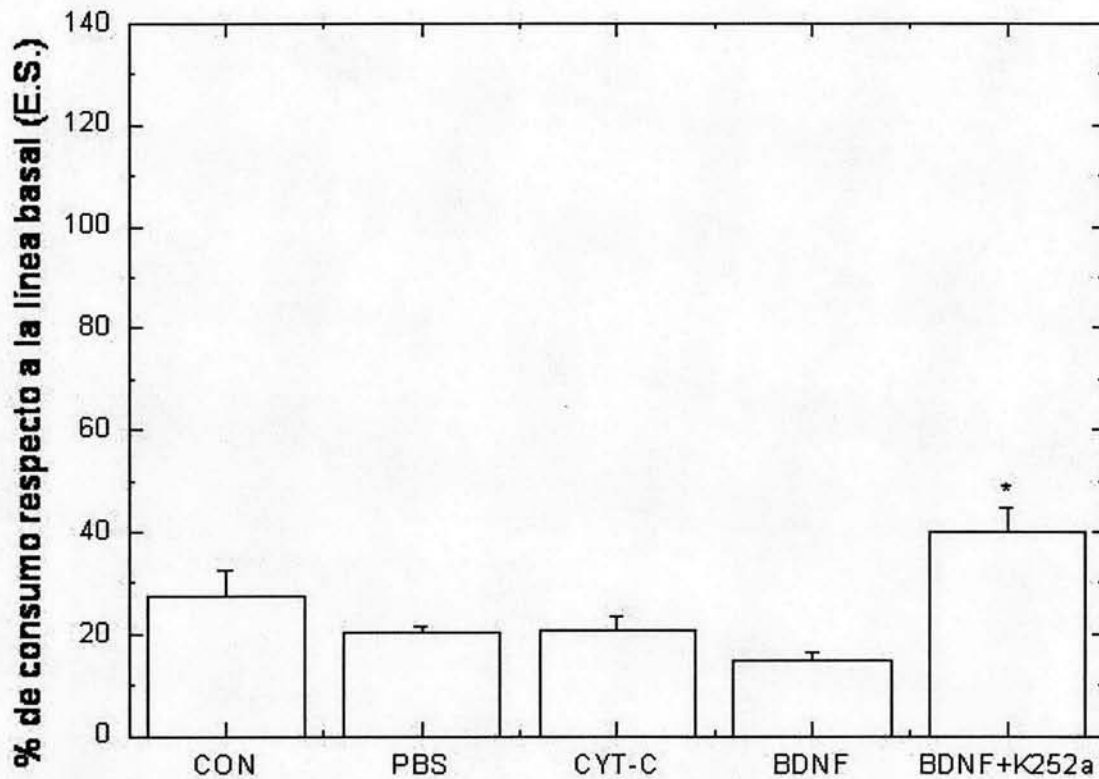
Gráfica 2. Participación del BDNF en la retención del condicionamiento aversivo a los sabores, durante la adquisición y nueve sesiones de extinción. La gráfica muestra el curso del consumo porcentual de la solución de sacarina respecto a la línea basal durante la sesión de adquisición (ADQ) y las sesiones de extinción (E1 a E9) de los grupos con, PBS, CYT-C, BDNF y BDNF + K252a, procesados tal como se describe en el procedimiento experimental. Se señalan diferencias significativas durante la tercera, cuarta, quinta, sexta y séptima sesiones entre el grupo BDNF y los grupos restantes (\*\*p< 0.0001, \*p<0.05).

### Consumo de la solución de sacarina durante la primera sesión de extinción (E1)



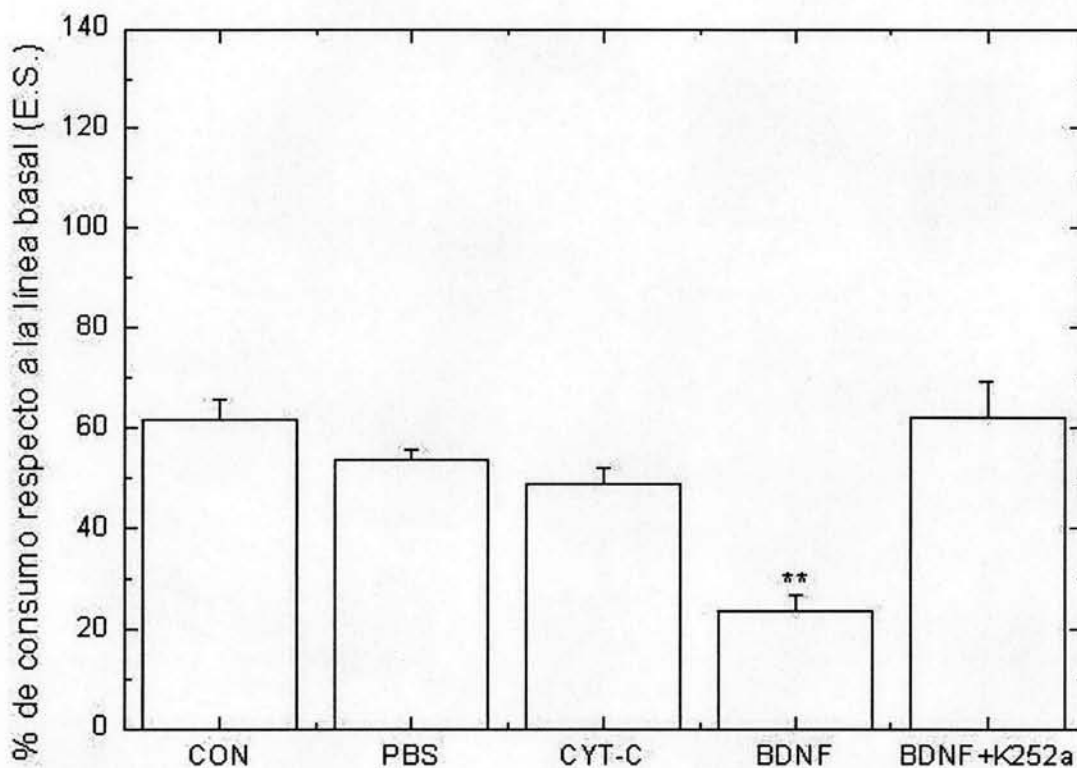
Gráfica 3. Efectos de la infusión de BDNF previa al entrenamiento del CAS durante la primera sesión de extinción. Se observan diferencias significativas en la primera sesión de extinción entre el grupo BDNF+ K252a, con respecto a los grupos CYT-C y BDNF, (\* $p < 0.05$ ).

## Consumo de la solución de sacarina durante la segunda sesión de extinción (E2)



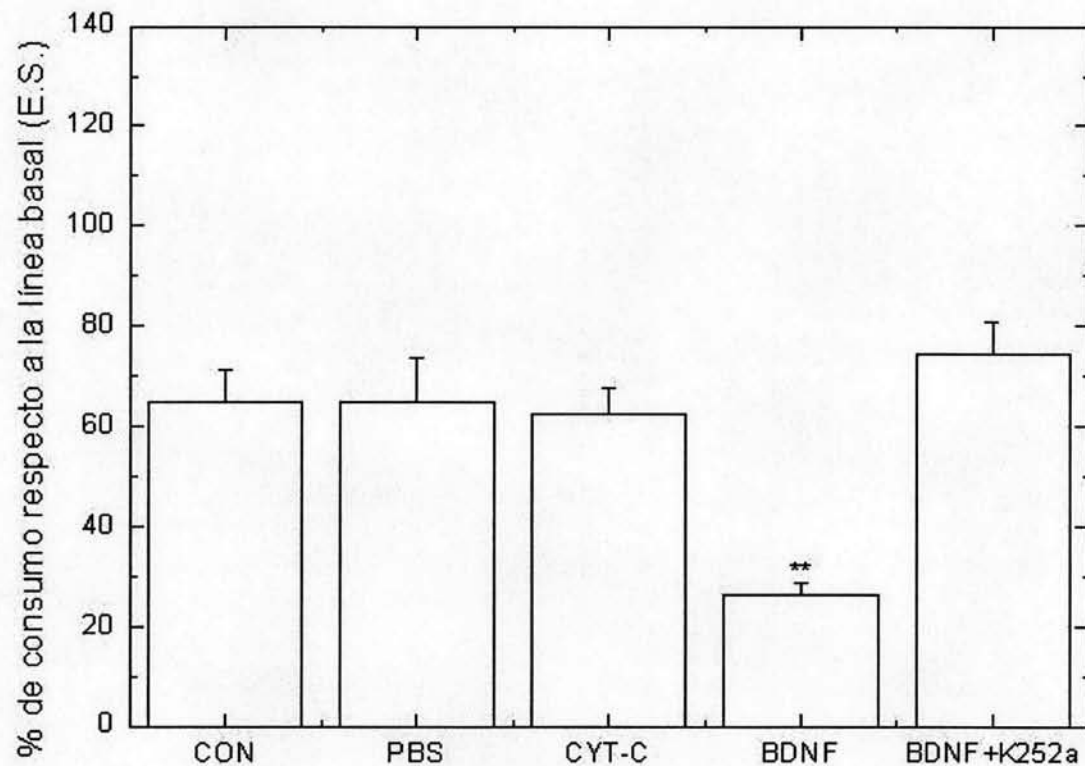
Gráfica 4. Efectos de la infusión de BDNF previa al entrenamiento del CAS durante la segunda sesión de extinción. Se observaron diferencias significativas en la segunda sesión de extinción entre el grupo BDNF + K252a con respecto a los demás grupos, (\* $p < 0.01$ ). Se observa nuevamente un incremento significativo para el grupo infundido con el inhibidor de los receptores Trk, lo que sugiere su acción sobre el BDNF endógeno.

### Consumo de la solución de sacarina durante la tercera sesión de extinción (E3)



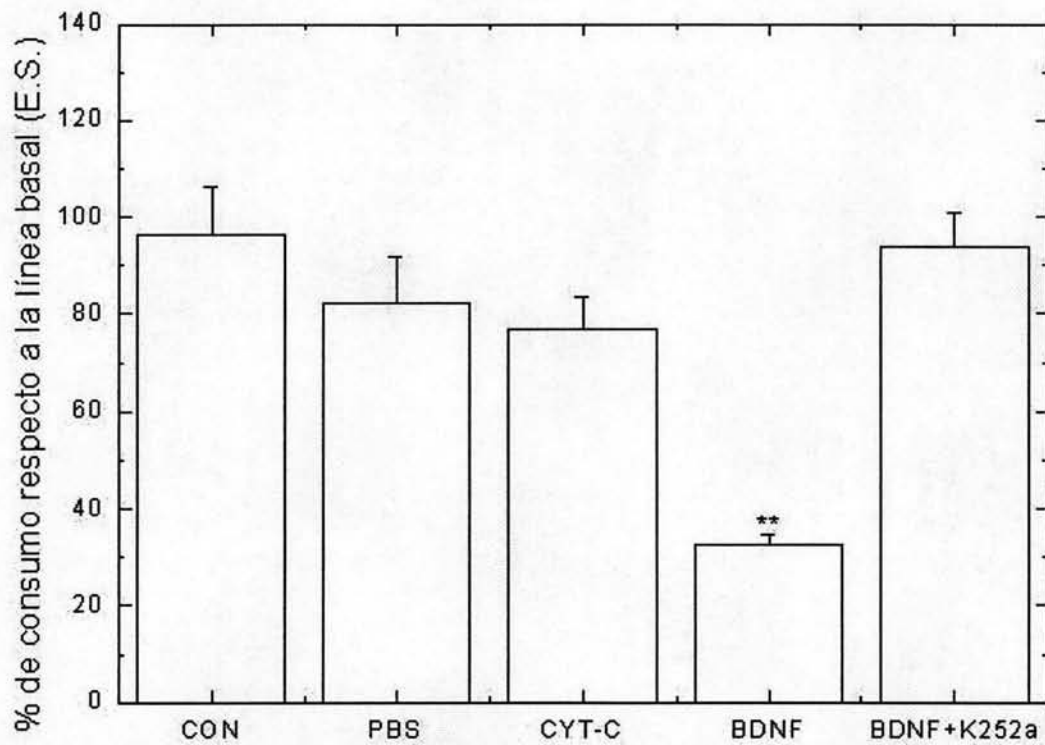
Gráfica 5. Efectos de la infusión de BDNF previa a la adquisición del CAS durante la tercera sesión de extinción. Los animales recibieron una infusión intracortical de BDNF o de las sustancias mencionadas en la metodología (3 $\mu$ g/3 $\mu$ l), 24 hrs. previas a la adquisición del CAS. El grupo control permaneció intacto sin la administración de ningún fármaco. Se observa que el grupo BDNF presenta un decremento significativo en el consumo de sacarina durante la tercera sesión de extinción en comparación con los demás grupos, (\*\*p< 0.0001).

### Consumo de la solución de sacarina durante la cuarta sesión de extinción (E4)



Gráfica 6. Efectos de la infusión de BDNF previa al entrenamiento del CAS durante la cuarta sesión de extinción. Se observa que en la cuarta sesión el grupo BDNF nuevamente tiene diferencias significativas en el consumo de sacarina en comparación con los otros grupos (\*\* $p < 0.0001$ ), lo que indica la aversión persistente ante el estímulo condicionado a diferencia de los demás grupos.

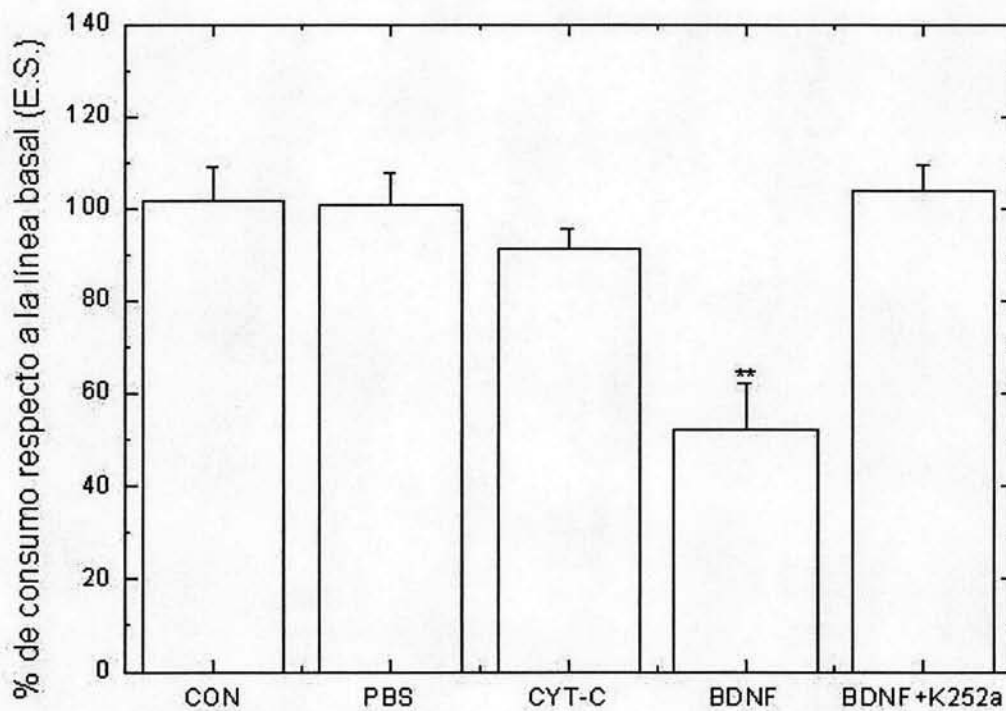
### Consumo de la solución de sacarina durante la quinta sesión de extinción (E5)



Gráfica 7. Efectos de la infusión de BDNF previa al entrenamiento del CAS durante la quinta sesión de extinción. Se sigue observando una diferencia altamente significativa para el consumo basal de sacarina del grupo BDNF con los grupos restantes (\*\* $p < 0.0001$ ). Mientras que los grupos CON, PBS, CYT-C y BDNF +K252a han incrementado su nivel de consumo, sin mostrar diferencias entre ellos.

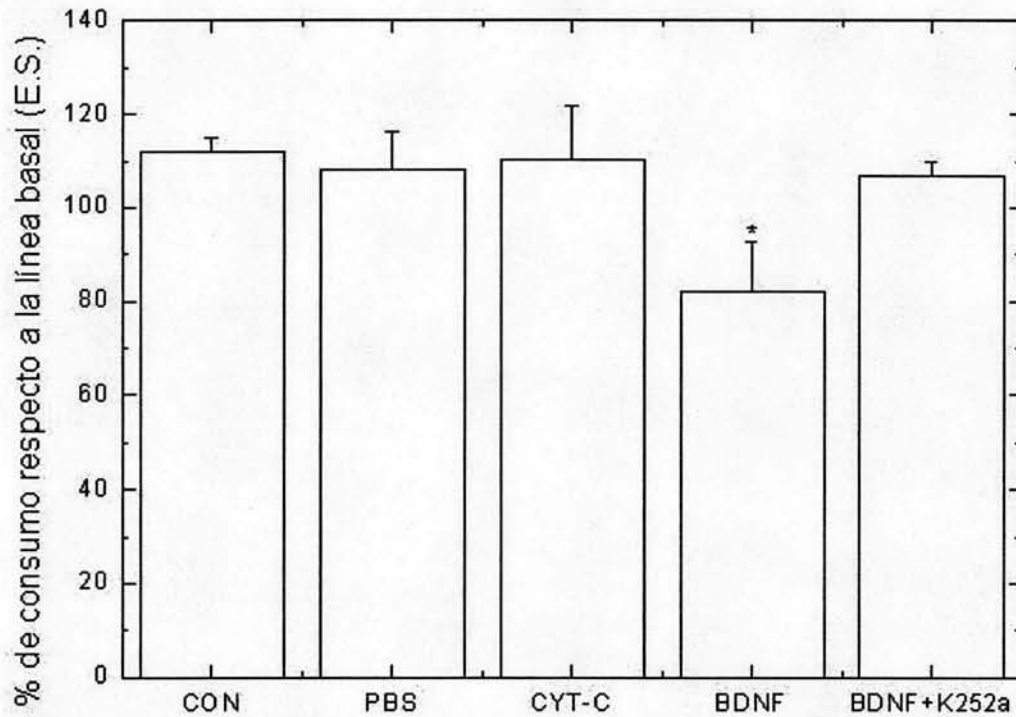


### Consumo de la solución de sacarina durante la sexta sesión de extinción (E6)



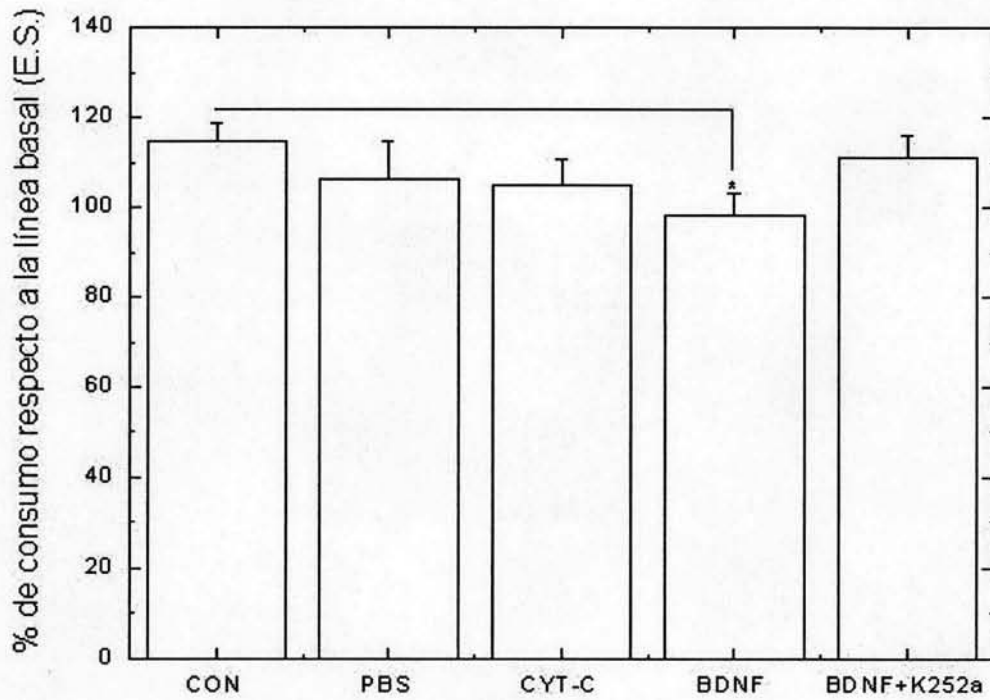
Gráfica 8. Efectos de la infusión de BDNF previa al entrenamiento del CAS durante la sexta sesión de extinción. La diferencia de consumo porcentual continúa siendo significativa para el grupo BDNF en comparación con los otros grupos (\*\* $p < 0.0001$ ). Esto indica la permanencia del incremento en la retención del estímulo aversivo en el grupo infundido con BDNF.

### Consumo de la solución de sacarina durante la séptima sesión de extinción (E7)



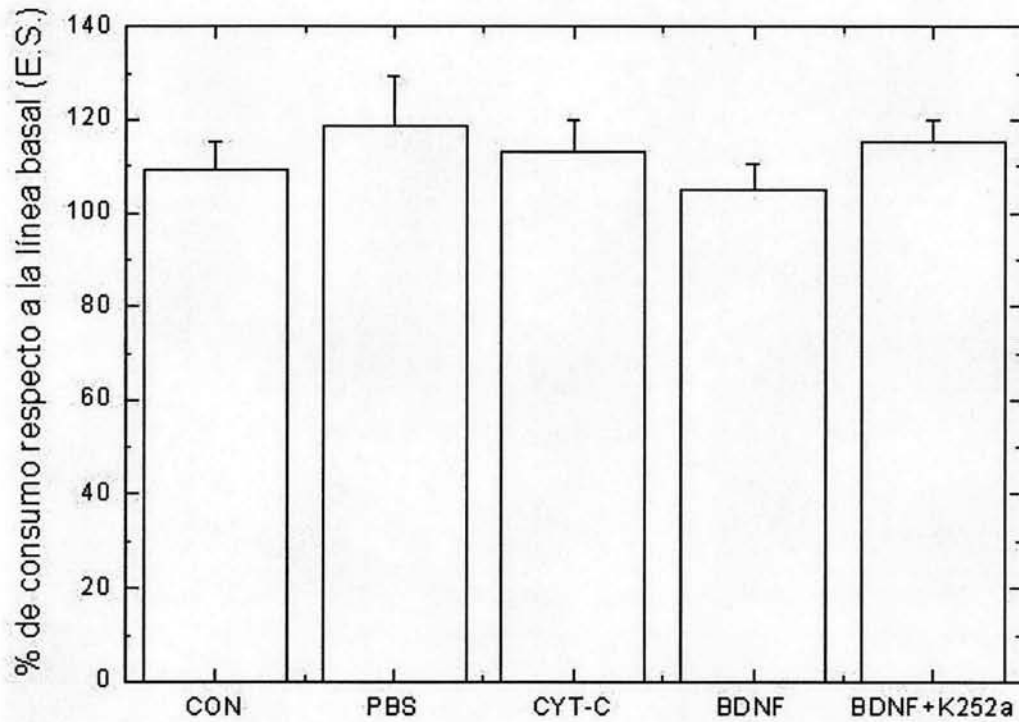
Gráfica 9. Efectos de la infusión de BDNF previa al entrenamiento del CAS durante la séptima sesión de extinción. Las diferencias en el consumo de sacarina son significativas para el grupo BDNF en relación con los demás grupos (\* $p < 0.05$ ). Los grupos CON, PBS, CYT-C y BDNF+K252a han alcanzado su línea base de consumo, mientras que el grupo BDNF presenta un retardo en la progresión para alcanzar a su línea basal.

### Consumo de la solución de sacarina durante la octava sesión de extinción (E8)



Gráfica 10. Efectos de la infusión de BDNF previa al entrenamiento del CAS durante la octava sesión de extinción. El grupo BDNF aún muestra una diferencia significativa con el grupo CON (control) (\* $p < 0.05$ ).

### Consumo de la solución de sacarina durante la novena sesión de extinción (E9)



Gráfica 11. Efectos de la infusión de BDNF previa al entrenamiento del CAS durante la novena sesión de extinción. No se observaron diferencias significativas en el consumo de sacarina durante la novena prueba de extinción para ningún grupo. En esta fase todos los grupos han alcanzado su nivel basal de consumo de la solución de sacarina.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En las últimas décadas dos campos científicos distintos han tenido un auge importante: el de la Neurobiología y el de la Psicología Cognitiva. Recientemente estos dos campos se han preocupado por trabajar de manera interdisciplinaria, para buscar los sustratos biológicos de procesos como la percepción, el lenguaje, la memoria y la conciencia. Dentro de éstos, las investigaciones sobre el aprendizaje y la memoria han tenido importantes avances. Esto nos ha dado la oportunidad de ir adentrándonos en el análisis de los mecanismos moleculares subyacentes a los procesos mentales (Kandel y Hawkins, 1992).

A principios del siglo XX Ramón y Cajal (1911) propuso que el sustrato físico de la memoria podría residir en las modificaciones más o menos perdurables en la fortaleza de la transmisión sináptica. Esta hipótesis fue retomada por prominentes neurobiólogos como Hebb y Marr, quienes formalizaron las bases teóricas que dirigen el estudio de los procesos celulares subyacentes al aprendizaje y la memoria.

### BDNF en el aprendizaje y la memoria

La memoria involucra cambios a corto plazo en las propiedades eléctricas y alteraciones estructurales a largo plazo en la sinapsis. El BDNF modula ambas formas de cambios sinápticos, lo que sugiere que juega un papel importante en el aprendizaje y la memoria (McAllister et al., 1999; Tyler et al., 2002; Yamada et al., 2002). El presente estudio muestra que la infusión aguda de BDNF en la corteza insular aumenta la retención de la tarea del CAS, lo cual concuerda con estudios en los que la participación del BDNF es fundamental para el almacenamiento de información en el sistema nervioso central (Kesslak et al., 1998, Ma et al., 1998, Mu et al., 1999, Mizuno et al., 2000 y Kesslak et al., 2003). Los resultados sugieren la participación del BDNF en los mecanismos que subyacen al almacenamiento de información llevado a cabo por la corteza insular. Por el contrario cuando se

administran anticuerpos para BDNF se observa un aprendizaje lento (Lupien et al., 2001; Yamada et al., 2002) también se ha observado que ratones carentes de BDNF muestran déficits en algunos tipos de tareas (Minichiello et al., 1999). En un estudio reciente Kesslak et al., (2003) muestran que la disminución de ARNm para BDNF afecta la adquisición de la tarea de aprendizaje espacial. En el presente estudio se observó que la presencia de la proteína es requerida para prolongar la retención del CAS en concordancia con estudios en los que el BDNF endógeno es requerido para la formación de la memoria de corto y largo plazo en una tarea aversiva (Johnston y Rose, 2001; Alonso et al., 2002). Conductualmente se han demostrado incrementos en la expresión de ARNm para BDNF en diferentes tareas de aprendizaje (Kesslak et al., 1998; Ma et al., 1998, Mizuno et al., 2000). Estudios recientes demostraron que las infusiones de BDNF producen incrementos dramáticos en la eficacia sináptica de larga duración que se asemejan al fenómeno de la LTP en rebanadas o cultivos hipocampales (Sherwood y Lo, 1999; Gooney y Lynch, 2001), en la corteza visual (Akaneya et al., 1997; Carmignoto et al., 1997; Ying et al., 2002) y recientemente en la corteza insular (Escobar, 2003). Escobar et al., (2000) demostraron que la inducción de LTP en la proyección (Bla-CI) previa al entrenamiento del CAS, aumenta la retención de esta tarea, lo cual se asemeja a los hallazgos del presente trabajo considerando la convergencia de los mecanismos celulares desencadenados por la LTP inducida tanto por estimulación eléctrica, como por infusión de BDNF. Así el presente estudio enfatiza la participación del BDNF como mediador molecular no solo de la plasticidad sináptica sino también de la interacción entre un organismo y su medio ambiente (Tyler et al., 2002).

### Mecanismos moleculares del BDNF en la corteza insular

Los estudios que se han realizado acerca de los mecanismos moleculares que se desencadenan tras la interacción del BDNF con su receptor [ver Fig.5] (Finkbeiner et al., 1997; Patapoutian y Reichardt, 2001; Minichiello et al., 2002; Ying et al., 2002), muestran la activación de patrones de señalización que involucran tres proteínas principalmente: MAPK, fosfolipasa-C (PLC) y fosfoinositol-3-fostato kinasa (PIK3). Posteriormente, estas proteínas activan una cadena de eventos moleculares



que finalmente translocan al núcleo (Gunn-More y Távare, 1998; Patapoutian y Reichardt, 2001) y una vez en el interior, transfieren un grupo fosfato para la activación del factor de transcripción CREB que participa en la modulación de la transcripción de una gran variedad de genes que contienen sitios sensibles a él, denominados CRE (cAMP responsive element). Unas de las proteínas que se activan en relación con esta cadena molecular son la sinaptobrevina y la sinaptofisina (Yamada et al., 2002) que están encargadas de la modulación del número de vesículas que se anclan a la terminal presináptica, induciendo así, la liberación de más neurotransmisor (Li et al., 1998), lo cual permite que las células respondan mejor a la estimulación. Como se mencionó anteriormente, la serie de eventos moleculares que se presentan a causa del fenómeno de la LTP presenta varias similitudes entre éstos y los eventos moleculares inducidos por medio del BDNF en la interacción con su receptor. La entrada de calcio al interior de la célula postsináptica, a través de los receptores NMDA, activa una serie de proteínas cinasas, que activan distintas vías de traducción en el interior de la célula haciendo posible el mantenimiento del incremento en la eficacia de la comunicación sináptica por períodos prolongados (Kennedy y Marder, 2002). La activación de estas proteínas permite la interacción con el núcleo activando el factor de transcripción CREB (Hagiwara et al., 1993) que participa en la modulación de la transcripción de una gran variedad de proteínas.

Es bien conocido que el BDNF juega un papel importante en el desarrollo cortical dependiente de la actividad y en la regulación de la excitabilidad cortical (Akaneya et al., 1997, Carmignoto et al., 1997, McAllister et al., 1999). La activación de la vía de señalización BDNF/TrkB afecta la formación de la memoria, implicando a la cadena de MAPK (Yamada et al., 2002). El aprendizaje espacial y la LTP incrementan la fosforilación de los receptores TrkB en el giro dentado, lo que sugiere la posible señalización del BDNF en los mecanismos subyacentes al aprendizaje espacial (Shaw et al., 2003). Recientes experimentos indican que la señalización BDNF/TrkB converge en la vía MAPK a través de la activación de ERK (extracelular signal-regulated kinase) para aumentar la transmisión sináptica *in vivo*, así como el aprendizaje conductual dependiente del hipocampo y de la neocorteza (Messaoudi et

al 2002; Tyler et al., 2002; Ying et al., 2002). Investigaciones realizadas por Jones y colaboradores en 1999, señalan que la LTP neocortical origina la activación de ERK. El incremento de la expresión de ARNm para BDNF ocurre en conjunto con el incremento de sinapsina y el receptor TrkB, lo que sustenta modificaciones pre y postsinápticas (Gómez-Pinilla y Kesslak, 2001). También se ha involucrado al BDNF y su receptor de alta afinidad TrkB en la formación de la memoria espacial en el hipocampo (Mizuno et al., 2003). Experimentos realizados con inhibidores del BDNF o de su receptor (como el K252a) debilitan o anulan la LTP así como la retención de diversas formas de aprendizaje (Ma et al., 1998; Mizuno et al., 2000). En el presente estudio el grupo infundido con la combinación BDNF+K252a, presentó una retención menor respecto a los demás grupos, durante la primera y segunda sesiones de extinción, lo que sugiere la influencia del bloqueador de los receptores Trk aún sobre las acciones de la neurotrofina endógena del sistema, durante la adquisición. Lo anterior subraya el que en los mecanismos que subyacen a la retención de información en la corteza insular participa la activación del BDNF en combinación con su receptor. La literatura reporta numerosos hallazgos en los que la presencia de BDNF exógeno incrementa la transmisión sináptica a través de sus receptores Trk en neuronas hipocampales, mientras que la presencia de la combinación K252a bloquea la depolarización de la membrana mediada por el BDNF (Kafitz et al., 1999; Levine et al., 1995).

En conclusión, el presente estudio muestra que la microinfusión intracortical aguda de BDNF (en concentraciones capaces de inducir LTP en ausencia de estimulación eléctrica) en la corteza insular de ratas adultas, incrementa significativamente la retención del condicionamiento aversivo a los sabores. El análisis estadístico muestra que el grupo infundido con BDNF no presenta diferencias significativas en la adquisición de la tarea, sino de la tercera a la séptima prueba de extinción, lo que subraya su participación en los procesos de almacenamiento más que sobre los de adquisición efectuados por la corteza insular. El presente estudio se une a las evidencias que demuestran que el BDNF y sus receptores TrkB participan en los procesos de aprendizaje y memoria (McAllister et al., 1999; Tyler et al., 2002; Yamada et al., 2002). En este caso en un área

neocortical asociada a los procesos de adquisición y almacenamiento de diversas tareas aversivas como el condicionamiento aversivo a los sabores (Bermúdez-Rattoni y McGaugh, 1991; Bermúdez-Rattoni et al., 1995; Escobar et al., 1998; Escobar y Bermúdez-Rattoni, 2000). La convergencia entre los patrones de señalización activados por BDNF/TrkB y por la estimulación capaz de inducir LTP, coadyuva a la comprensión de los mecanismos celulares que subyacen a los cambios en la eficiencia sináptica implicados en los procesos de aprendizaje y memoria. Las investigaciones en torno a las bases biológicas del aprendizaje y la memoria han ido confirmando el postulado que Ramón y Cajal realizó en 1894, al afirmar que nuestro cerebro sufre modificaciones funcionales a través de lo que experimentamos. Esta visión cada día más aceptada, trae implicaciones importantes para el estudio de los procesos mentales y para toda la Psicología en general.

## 7. REFERENCIAS

- Abel, T., Nguyen, P.V., Barad, M. Deuel, T.A., Kandel E.R. y Bourtchouladze, R. (1997). "Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory". *Cell*, 88: 615-626.
- Abraham, W.C. y Hugett, A. (1997). "Induction and reversal of long-term potentiation by repeated high-frequency stimulation in rat hippocampal slices". *Hippocampus*, 7: 137-145.
- Akaneya, Y., Tsumoto, T., Kinoshita, S. y Hatanaka, H. (1997). "Brain-derived neurotrophic factor enhances Long-term potentiation in rat visual cortex". *Journal of Neuroscience*, 17: 6707-6716.
- Alonso, M., Vianna, R.M., Depino, M., Mello e Souza, T., Pereira, P., Szapiro, G., Viola, H., Pitossi, F. Izquierdo, I. y Medina, J. (2002). "BDNF-triggered events in the rat hippocampus are required for both short- and long-term memory formation". *Hippocampus*, 12: 551-560.
- Aoki, C., Wu. K., Elste, A., Len, G., Lin, S., McAuliffe, G. y Black, B.I. (2000). "Localization of brain-derived neurotrophic factor and TrkB receptors to postsynaptic densities of adult rat cerebral cortex". *Journal of Neuroscience Research*, 59: 454-463.

Artola, A. y Singer, W. (1990). "The involvement of N-methyl-D-aspartate receptors in induction and maintenance of long-term potentiation in rat visual cortex". *European Journal of Neuroscience*, 2: 254-269.

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

Bailey, C.H. y Kandel, E.R. (1993). "Structural changes accompanying memory storage". *Annual Review Physiology*, 55, 397-426.

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

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

Barria, A., Derkach, V. y Soderling, T. (1997). "Identification of the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase liphophosforilation site in the alpha-amino-3-hydroxil-5-methyl-4-isoxazole-propionate-type glutamate receptor". *Journal of Biological Chemistry*, 272: 32727-30.

Bear, M. y Kirkwood (1993). "Neocortical long-term potentiation". *Current Opinion Neurobiology.*, 3: 197-202.

Bear, M., Connors, B. y Paradiso, M. (2001). *Neuroscience: Exploring the Brian*. Williams & Wilkins, Baltimore USA. pp. (614).

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

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

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

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

Bernstein, I. (1991). "Flavor Aversion" en T.V. Getchell, R.L. Doty, L.M. Bartoshuk y J.B. Snow, Jr. (Eds). Smell and Taste in Health and Disease. Raven Press: USA.

Blair, H. T., Shafe, G.E. Bauer, E.P, Rodrigues, S.M. y LeDoux, J.E. (2001). "Synaptic plasticity in the lateral amygdala a cellular hypothesis of fear conditioning". Learning and Memory, 8: 229-242.

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

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

Boulton, A.A., Baker, G.B. y Hefti, F. (1993). Neuromethods. (Vol. 25): Neurotrophic Factors. Human Press. Estados Unidos. pp (440).

Bounomano, D.V. y Merzenich, M.M. (1998). "Cortical plasticity". Annual Review of Neuroscience. 21: 149-186.

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

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

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

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

Bures, J. (1998). "Ethology, physiological psychology and neurobiology of CTA" en Bures, J., F. Bermúdez Rattoni y T. Yamammoto (1998). Conditioned Taste Aversion. Oxford Science Plublication, USA.

Burns, M. E. y Augustine, G. J. (1995). Synaptic structure and function: dynamic organization yields architectural precision. Cell, 83: 187-94.



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

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

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

Collin, C., Vicario-Abejon, C., Rubio, M.E. Wenthold, R.J., McKay, R.D.G. y Segal, M. (2001). Neurotrophins act at presynaptic terminals to activate synapses among cultured hippocampal neurons. *European Journal of Neuroscience*, 13: 1273-1282.

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

Dash, P.K., Hochner, B. y Kandel, E.R. (1990). "Injection of the cAMP-responsive element into the nucleus of *Aplysia* sensory neurons blocks long-term facilitation". *Nature*, 345: 718-721.

Davis, H.P. y Squire, L.R. (1984). "Protein synthesis and memory: a review. *Psychology Bulletin*, 96: 518-559.

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

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

Debanne, B.H., Gahwiler y Thompson, S.M. (1996). "Cooperative interactions in the induction of long-term potentiation and depression of synaptic excitation between hippocampal CA3-CA1 cell pairs *in vitro*". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 11225-11230.

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

Doyere, V., Srebro, B. y Laroche, S. (1997). "Heterosynaptic LTD and depotentiation in the medial perforant path of the dentate gyrus in the freely moving rat. *Journal of Neurophysiology*, 77: 571-578.



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Fanselow, M.S. y LeDoux, J.E.(1999). "Why we think plasticity fear conditioning occurs in the basolateral amygdala". *Neuron*, 23: 229-232.

Figurov, A., Pozzo Miller, L.D., Olafsson, P., Wang, T. and Lu, B. (1996). "Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus". *Nature*, 381: 706-709.

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

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

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

García, J., Hankins, W.G. y Rusiniak, K.W. (1974). "Behavioral regulation of the milieu interne in man and rat". *Science*, 185, 824-831.

García, J., y Koelling, Y. (1966). "Relation of cue to consequence in avoiding learning". *Psychonomic Science*, 4: 123-124.

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

Gómez-Pinilla, F., So, V. y Kesslak, J.P. (2001). "Spatial learning induces neurotrophin receptor and synapsin I in the hippocampus". *Brain Research*, 904: 13-9.

Gunn-Moore, F. y Tavaré M. (1998). "Understanding the molecular mechanism of neurotrophic factor signalling". *Cell*, 10: 151-157.

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

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

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

Hirsch, J.C. y F. Crepel (1990). "Use-dependent changes in synaptic efficacy in rat prefrontal neurons *in vitro*". *Journal of Physiology*, 427: 31-49.

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

Ip, N.Y., Ibáñez, C.F., Nye, S.H., McClain, J., Jones, P.F., Gies, D.R., Belluscio, L., LeBeau, M.M., Espinosa, R., Squinto, S.P. Persson, H. y Yancopoulos, G.D. (1992). "Mammalian Neurotrophin-4: Structure, Chromosomal Localization, Tissue Distribution, and Receptor Specificity". *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89: 3060-3064.

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

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

Jankowsky, J.L. y Patterson, P. H. (1999). "Cytokine and growth factor involvement in long-term potentiation". *Molecular and cellular neuroscience*, 14, 237-286.

Jiang, B., Akaneya, Y., Ohshima, M., Ichisaka, S., Hata, Y y Tsumoto, T. (2001). "Brain derived neurotrophic factor induces long lasting potentiation of synaptic transmission in visual cortex *in vivo* in young rats, but not in the adult". *European Journal of Neuroscience*, 14: 1219-1228.

Jones, M.W., French, P.J., Bliss, T.V. y Rosenblum, K. (1999). "Molecular mechanism of long-term potentiation in the insular cortex *in vivo*". *Journal of Neuroscience*. 19(21).

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

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

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

Kandel, E. y Hawkins, R. (1992). "Bases biológicas del aprendizaje y la individualidad". *Investigación y Ciencia*. 12: 49-57.

Kang, H. y Schuman, E. M. (1995). "Long-lasting neurotrophin –induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus". *Science*, 267: 1658-62.

Kang, H. Welchler, A., Shelton, D. y Schuman, E. (1997). "Neurotrophins and time: different roles for TrkB signaling in hippocampal long-term potentiation". *Neuron*, 19: 653-664.

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

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

Kennedy, M.B. y Marder, E.M. (1992). "Cellular and molecular mechanism of neuronal plasticity". *Introduction to molecular neurobiology*. Ed. by Hall ZW. Massachusetts: Sinauer Associates INC, pp. 463-495.

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

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

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

Kirkwood, A., Lee, H., Bear, M. (1995). Co-regulation of long-term potentiation and experience-dependent synaptic plasticity in visual cortex by age and experience. *Nature*. 375: 328-331.

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

Kohara, K., Kitamura, A., Morishima, M. y Tsumoto, T. (2001). "Activity-dependent transfer of brain-derived neurotrophic factor to postsynaptic neurons". *Science*, 291: 2419-2423.

Komatsu, Y., K. Fujii, J. Maeda and H. Sakaguchi y K. Tomaya (1988). "Long-term potentiation of synaptic transmission in kitten visual cortex". *J Neurophysiology*, 59:124-141.

Komatsu, Y., Toyama, K., Maeda J. y Sakaguchi, H. (1981). "Long-term potentiation investigated in a slice preparation of striate cortex of young kittens". *Neuroscience Letters*. 26:269-274.

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

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

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

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

Lee, S.M., Weisskopf, M.G. y Ebner, F.F. (1991). "Horizontal long-term potentiation of responses in rat somatosensory cortex". *Brain Research*, 544: 303-310.

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

Li, Y.X., Zhang, Y., Lester, H.A., Shuman , E.M., y Davidson, N. (1998). "Enhancement of neurotransmitter release induced by BDNF in cultured hippocampal neurons". *Journal of Neuroscience*, 18: 10231-10240.

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

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

Lupien, S.J. y Lepage, M. (2001). "Stress, memory, the hippocampus: Can't live with it, can't live without it", *Behavioral Brain Research*, 127: 137-158.

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



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

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

Malenka, R.C. (1994). "Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD". *Cell*, 78(4): 535-538.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Meakin, S.O. y Shooter, E.M. (1992). *TINS*, 15: 323-331.



Messaoudi, E., Bardsen, K., Srebro, B. y Bramham, C. (1998). "Acute intrahippocampal infusión of BDNF induces lasting potentiation of synaptic transmisión in the rat dentate gyrus, *Journal of Neurophysiology*, 79: 496-499.

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

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

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

Miranda, M.I. y McGaugh, J.L., (2003). "Enhancement of inhibitory avoidance and conditioned taste aversion memory with insular cortex infusion of 8-Br-cAMP: involment of basolateral amygdala", *Learning and Memory* (publicación en proceso).

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

Montarolo, P.G., Goelet, P., Castellucci, V.F., Morgan, J., Kandel, E.R. y Schacher, S. (1986). "A critical period for macromolecular synthesis in long-term heterosynaptic facilitation in *Aplysia*". *Science*, 234: 1249-1254.

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

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

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

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

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

- Nerad, L., Ramírez-Ayala, V., Ormsby, C.E. y Bermúdez-Rattoni, F. (1996). "Differential effects of anterior and posterior insular cortex lesions on the acquisition of conditioned taste aversion and spatial learning". *Neurobiol. Learn. Mem.*, 66: 44-50.
- Nguyen, P.V., Abel T y Kandel, E.R. (1994). "Requeriment of critical period of transcription for induction of a late phase of LTP". *Science*, 262: 1104-1107.
- Nicoll, R.A. y Malenka, R.C. (1995). "Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus". *Nature*, 377: 115-118.
- Patapoutian, A. y Reichardt, L.F. (2001). "Trk receptors: mediators of neurotrophin action". *Curr. Op. Neurobiol.*, 11: 272-280.
- Patterson, S. L., Abel T., Deuel, T .A., Martin, K. C., Rose J. C. y Kandel (1996). "Recombinant BDNF recues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice". *Neuron*, 16, 1137-1145.
- Patterson, S, L., Pittenger, C., Martin, K.C., Scanlin, H., Drake, C., y Kandel, E. R., (2001). "Some forms of cAMP-mediated long-lasting potentiation are associated with release of BDNF and nuclear translocation of phospho-MAP kinase". *Neuron*, 32, 123-140.
- Paxinos, G. y Watson, C. (1995). "The Rat Brain in the stereotaxic coordinates". Academic Press, Orlando Fl.
- Polster, M.R., Nadel, D. y Schacter, L. (1991). "Cognitive neuroscience. Analysis of memory : A historical perspective", *Journal of Cognitive Neuroscience*, 3: 95-116.
- Poo Mu-ming (2001). "Neurotrophins as synaptic modulators". *Nature Review Neuroscience*, 2: 24-32.
- Rampon C., Tang Y.P., Goodhouse J., Shimizu E., Kyin M. y Tsien Z. (2000). "Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice". *Nature Neuroscience*, 3: 238-244.
- Rampon C. y Tsien Z. (2000). " Genetic analysis of learning behavior-induced structural plasticity". *Hippocampus*, 19: 605-609.
- Riout-Pedotti, M.S., Friedman, D. y Donoghue, J.P. (2000). "Learning-induced LTP in neocortex". *Science*, 290: 533-536.
- Richardson, S.J. (1973). "The amygdala: historical and functional analysis". *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 33: 623-648.

- Roberts, L.A., Large, C.H., O' Shaughnessy, C.T. y Morris, B.J. (1997). "Long term potentiation in perforant path/granule cell synapses is associated with a post-synaptic induction of proekephalin gene expression". *Neuroscience Letters*, 227: 205-208.
- Roesler, R., Roozendaal, B., y McGaugh, J.L. (2002). "Basolateral amygdala lesions block the memory-enhancing effect of 8-Br-cAMP infused into the entorhinal cortex of rats after training", *Europea Neuroscience*, 15: 905-910.
- Rogan, M.T., Staubli, U.V. y LeDoux, J.E., (1997). "Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala". *Nature*, 390: 604-607.
- Schinder, A.F. y Poo M.M. (2002). "The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity". *TINS*, 23: 639-645.
- Schuman, E. (1997). "Growth factors sculpt the synapses". *Science*, 275: 1277-1278.
- Segal, R.A. y Greenberg, M.E. (1996). "Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors". *Annu. Rev. Neurosc.*, 19: 463-489.
- Shaw N., Commins S. y O'Mara M. (2003). "Deficits in spatial learning and synaptic plasticity induced by rapid and competitive broad-spectrum cyclooxygenase inhibitor ibuprofen are reversed by increasing endogenous brain-derived neurotrophic factor", *European Journal of Neuroscience*, 17: 2438.
- Sherwood, N.T. y Lo L, D. (1999). "Long term enhancement of central synaptic transmission by chronic BDNF treatment". *Journal of Neuroscience* . 19: 7025-7036.
- Silva, A.J. Kogan, J.H. Frankland, P.W. y Kida, S. (1998). "CREB and memory". *Annual Review of Neuroscience*, 21: 127-148.
- Swanson, L. W. y Petrovich, G. D. (1998). "What is the amygdala?". *Trens in Neurosciences*, 21, 323-331.
- Tang, Y.P., Shimizu, E., Dube, G.R., Rampon, C., Kerchner, G.A., Zhuo, M., Guosong, L. y Tsien, J.Z. (1999). "Genetic enhancement of learning and memory in mice". *Nature*, 401: 63-69.
- Travers, S.P. (1993). "Orosensory processing in neural systems of the nucleus of the solitary tract" en S.A. Simon y S.T. Roper (Eds.) *Mechanisms of Taste Transduction*". CRC Press: USA. pp. 339-394.
- Tsumoto, T. (1992). "Long-term potentiation and long-term depression in the neocortex". *Prog. Neurobiol.*, 39: 209-228.
- Tully, T. (1991). "Physiology of mutations affecting learning and memory in *Drosophila*: the missing between gene product and behavior". *TINS*, 14: 163-164.

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

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

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

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

Varon S. (1985). *Discuss. Neurosci.* (2): 1-62.

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

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

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

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

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

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