

01985



# Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Psicología  
División de Investigación y Estudios de Posgrado  
Neurociencias de la Conducta

## PARTICIPACIÓN DEL FACTOR NEUROTRÓFICO DERIVADO DEL CEREBRO EN LA REGULACIÓN DE LA PLASTICIDAD SINÁPTICA NEOCORTICAL

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTORA EN PSICOLOGÍA  
P R E S E N T A :  
LIC. YAZMÍN FIGUEROA GUZMÁN

Directora de Tesis:  
DRA. MARTHAL ESCOBAR RODRÍGUEZ

MÉXICO, D.F.

FEBRERO 2005



m343343



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

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

NOMBRE: Yaelmín Figueroa Hernández

FECHA: 20/abril/2005

FIRMA: Yaelmín F. H.

**BELIEVE IN YOURSELF!!**

## AGRADECIMIENTOS:

*Quiero agradecer, primero que nada, a Dios porque en los momentos más difíciles me dio la fuerza para seguir luchando.*

*A mami y a papi por enseñarme a luchar por las cosas que quiero. mami, me apoyaste en las buenas y en las no tan buenas, siempre con los brazos abiertos para darme ese cariño de madre cuando más lo necesitaba. Papi, gracias por darme el "empujón" cada vez que dudaba de mí misma, con tu frase de "tú puedes, eres la mejor" me diste esperanzas y fuerzas para soportar un día más... siempre haz tenido razón: "hay que darle tiempo al tiempo".*

*A mi esposo Manuel, por creer en mí cuando todo el mundo apostaba en mí contra. Gracias por darme la fortaleza de creer en mí misma sin importar lo que los demás piensen, por hacerme feliz y atreverte a compartir el resto de tu vida conmigo. Eres mi apoyo, mi paño de lágrimas y la razón para amanecer cada día.*

*A mi abuelita gloria (Dios la tenga en sí santa gloria) por enseñarme a que puedo conseguir lo que yo quiera simplemente siendo yo misma. Se que aunque físicamente no estas conmigo tú espíritu me acompaña y me cuida siempre.*

*A mi suegra María Lilia, por hacerme muy bien su papel de mamá sustituta aquí en México. Gracias por aceptarme como otra de tus hijas, apoyarme siempre y por cuidar de Sebastiane.*

*A mis hermanos, Yasi y Yariel, los adoro con mi alma. Yasi eres mi ejemplo a seguir, de que cuando se quiere se puede.*

*Ivette y Vicky, son muy especiales. Gracias por cuidar a los viejos en mi ausencia. No me da esta vida para agradecerles.*

*Ruthyta más que mi mejor amiga eres mi hermana... 22 años de amistad no es fácil. Gracias por estar conmigo siempre, hemos pasado muchas cosas juntas y lo que nos falta. Eres el ejemplo de que no hay que nacer dentro de la misma familia para ser hermanas. Jamy... mi confidente y mi consejera. Gracias por no olvidarte de que vivo en México y de estar ahí cuando más te he necesitado. No importa lo lejos que estamos, siempre estamos cerca. Yamilesi, Julia y Erica, gracias por ser las mejores amigas del mundo.*

*Sebastiane, eres el que deposita en mí una sonrisa cada día, no importa lo mal que me haya ido. Gracias por acompañarme en esas largas noches de estudio.*

*Quiero agradecer a mis sinodales por su apoyo y consejo a través de todo este tiempo. Gracias por su voto de confianza.*

# INDICE

|      |  |    |
|------|--|----|
| I.   | <b>INTRODUCCIÓN</b> .....  | 4  |
|      | <b>1.1. Los factores neurotróficos y el sistema nervioso central</b> .....                   | 6  |
|      | 1.1.1. Aspectos generales de las neurotrofinas .....   | 6  |
|      | 1.1.2. Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro .....  | 8  |
|      | <b>1.2. Potenciación a Largo Plazo</b> .....   | 11 |
|      | 1.2.1. Características de la LTP .....   | 13 |
|      | 1.2.2. LTP y aprendizaje .....   | 14 |
|      | 1.2.3. Mecanismos moleculares .....  | 16 |
|      | 1.2.4. BDNF y LTP.....   | 20 |
|      | 1.2.5. LTP en la neocorteza .....  | 21 |
|      | <b>1.3. Corteza Insular</b> .....  | 22 |
|      | 1.3.1. Descripción de la corteza insular .....   | 22 |
|      | 1.3.2. Aferencias gustativas a la corteza insular .....                                      | 24 |
|      | 1.3.3. Paradigmas de aprendizaje involucrados en la<br>actividad de la corteza insular ..... | 26 |
|      | <b>1.4. Consideraciones generales acerca del aprendizaje y la memoria</b> ...                | 27 |
|      | <b>1.5. Condicionamiento Aversivo a los Sabores</b> .....                                    | 28 |
|      | 1.5.1. La amígdala y el CAS .....  | 30 |
|      | <b>1.6. BDNF, LTP, CAS y CI</b> .....  | 31 |
| II.  | <b>PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....   | 32 |
| III. | <b>OBJETIVOS</b> .....   | 33 |
| IV.  | <b>PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL</b> .....  | 33 |
|      | <b>4.1. Metodología general</b> .....  | 33 |
|      | 4.1.1. Sujetos.....  | 33 |
|      | 4.1.2. Electrofisiología .....   | 33 |
|      | 4.1.3. Canulación .....  | 34 |
|      | 4.1.4. Condicionamiento Aversivo a los Sabores .....   | 35 |
|      | 4.1.5. Histoquímica de Nissl.....  | 36 |
|      | 4.1.6. Inmunohistoquímica para BDNF .....  | 37 |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.1.7. Fase I (Participación del BDNF en la generación de la LTP<br>neocortical) .....  | 38        |
| 4.1.7. Fase II (Participación del BDNF en el CAS) .....   | 39        |
| V. <b>RESULTADOS</b> .....  | <b>40</b> |
| 5.1.1. Fase I (Participación del BDNF en la generación de la LTP<br>neocortical) .....  | 40        |
| 5.1.2. Fase II (Participación del BDNF en el CAS) .....   | 44        |
| VI. <b>DISCUSION Y CONCLUSIONES</b> .....   | <b>48</b> |
| VII. <b>REFERENCIAS</b> .....   | <b>54</b> |
| VIII. <b>Apéndice</b>   |           |
| 8.1.1. In vivo insular cortex LTP induced by brain-derived neurotrophic factor<br><b>Brain Research (2003), 991: 274-279.</b> |           |

## I. INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas más ampliamente investigados por la neurociencia moderna consiste en descifrar los mecanismos por los cuales los cambios inducidos por la experiencia en el sistema nervioso central se traducen en adquisición, consolidación, retención y subsecuente evocación de la información. Las neurotrofinas han emergido recientemente como potentes mediadores moleculares, no solamente de la plasticidad sináptica, sino también de las interacciones conductuales entre un organismo y su ambiente (Tyler et al., 2002).

Evidencias recientes señalan que las neurotrofinas efectúan acciones diferentes a los efectos clásicos sobre la diferenciación y sobrevivencia neuronales. Esta posibilidad se ve respaldada por numerosos hallazgos entre los que podemos mencionar, que la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en la neocorteza visual experimenta un rápido y significativo incremento debido a la actividad neuronal (Bozzi et al., 1995). Aunado a lo anterior, se ha reportado que la adición de BDNF o NT-3 produce dramáticos incrementos de larga duración en la transmisión sináptica (similares a la potenciación de largo plazo) en rebanadas o cultivos neuronales hipocampales procedentes de roedores adultos (Kang & Schuman, 1995; Levine et al., 1995). Recientemente se ha demostrado que el BDNF induce la potenciación de largo plazo de la transmisión sináptica en la corteza visual, in vivo, en ratas jóvenes, pero no en adultas (Jiang et al., 2001).

La Corteza Insular (CI) ha resultado de gran interés no solo por su participación en el procesamiento de estímulos gustativos (Braun 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 & Everitt, 1988; Escobar et al., 1989; Bermúdez-Rattoni & McGaugh, 1991). Se ha demostrado que lesiones bilaterales en la CI afectan la adquisición y retención del condicionamiento aversivo a los sabores (CAS) (Yamamoto et al., 1980; Brown et al., 1982). 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 participación de la conectividad entre la CI y la amígdala durante la adquisición y el recuerdo de esta tarea.

Algunas de las características más importantes del CAS son: su selectividad hacia los estímulos gustativos, el que un solo entrenamiento baste para obtener una fuerte respuesta aversiva ante un sabor novedoso, y algo muy peculiar es el que sea posible la asociación entre el estímulo condicionado y el estímulo incondicionado cuando entre ambos median tiempos bastante amplios, desde minutos hasta horas (Bernstein, 1991).

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 & Price, 1974; Escobar et al., 1989; Bermúdez-Rattoni et al., 1997). Recientemente, se ha logrado inducir potenciación de largo plazo (LTP) in vivo en la CI mediante la estimulación de alta frecuencia de las aferentes provenientes del Bla; el incremento en la respuesta sináptica de esta vía se conserva por un periodo de por lo menos una hora y su inducción puede ser bloqueada por la aplicación de antagonistas de los receptores glutamatérgicos de tipo NMDA (Escobar et al., 1998b; Escobar et al., 2002). Estos resultados son de particular interés en cuanto a que demuestran que las modificaciones en la eficiencia sináptica dependientes de la actividad, están presentes en esta región cortical, sugiriendo que la LTP de la vía Bla-CI constituye un posible mecanismo para las funciones mnémicas realizadas por la CI. Así mismo, en estudios previos se demostró que la inducción de LTP en la proyección de la amígdala basolateral a la corteza insular, previa al entrenamiento del CAS, aumenta la retención en esta tarea (Escobar et al., 2000).

Basándonos en lo antes expuesto, este estudio pretende probar la influencia que ejercen las neurotrofinas, en particular el BDNF, sobre los cambios en la fortaleza de la transmisión sináptica que se traducen en el fenómeno de potenciación a largo plazo de la neurotransmisión neocortical in vivo, así como su contribución sobre las funciones cognitivas en las que interviene la neocorteza insular.

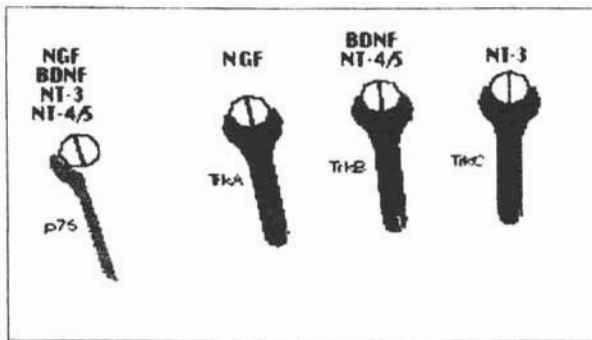


## **1.1 Los factores neurotróficos y el sistema nervioso central**

### **1.1.1. 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 sinapsis. Entre los mensajeros involucrados en la comunicación neuronal que da origen a estos procesos, se encuentran ciertas moléculas denominadas factores tróficos, o factores neurotróficos, que son proteínas que controlan la sobrevivencia, el crecimiento y las capacidades funcionales de poblaciones específicas de neuronas. En el sistema nervioso central las neurotrofinas regulan el crecimiento dendrítico de las neuronas piramidales durante el desarrollo de la neocorteza (McAllister et al., 1995; Baker et al., 1998).

Los factores tróficos se agrupan en familias, tomando en consideración dos criterios; a) las poblaciones celulares sobre las que actúan, es decir, considerando sus células blanco, b) su estructura, puesto que algunos factores tróficos presentan obvias similitudes estructurales en sus secuencias aminoácidas (Escobar, 1994). La familia de las neurotrofinas está constituida por los siguientes miembros: factor de crecimiento neuronal (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3), neurotrofina-4/5 (NT-4/5), neurotrofina-6 (NT-6) y neurotrofina 7 (NT/7) (Lessman et al., 2003). Tanto el NT-6 como el NT-7 sólo se han encontrado en peces (Gotz et al., 1994; Lai et al., 1998). Las neurotrofinas efectúan sus acciones a través de dos clases de receptores, los de alta afinidad, como la tirosina cinasa (receptores Trk) y los de baja afinidad, como el p75 (Bothwell, 1991; Chao, 1992; Meakin & Shooter, 1992; Barbacid, 1994; Dechant et al., 1994; Lindsay et al., 1994, Ip & Yancopolous, 1996; Segal & Greenberg, 1996; Lessmann et al., 2003) Algunos genes estrechamente relacionados con el TrkA, tales como el TrkB y TrkC, codifican proteínas que actúan como receptores para el BDNF, NT-3 y NT-4/5 respectivamente (Ip et al., 1992) (Figura 1).



**Figura 1.** Representación esquemática de los receptores de alta y baja afinidad de las neurotrofinas (Modificado de Bear, 2002)

Tanto el NGF como el BDNF y la NT-3 presentan amplia difusión en el sistema nervioso central (SNC) de mamíferos, en particular en el hipocampo y la neocorteza, donde se ha observado que sus niveles dependen de la actividad neuronal (Ghosh, et al., 1994).

Recientemente se ha examinado la posibilidad de que las neurotrofinas estén involucradas en la regulación de la plasticidad sináptica dependiente de la actividad (Carmignoto et al., 1997). Según McAllister, Katz & Lo (1999) para que las neurotrofinas tengan un rol significativo en la plasticidad sináptica deben cumplir con los siguientes criterios:

- a. las neurotrofinas y sus receptores deben expresarse en el lugar indicado y en el momento indicado para que ocurra plasticidad sináptica,
- b. la expresión y la secreción de la neurotrofina debe ser dependiente de la actividad,
- c. las neurotrofinas deben regular aspectos de la función neuronal que cambien la actividad de los circuitos neuronales, incluyendo la función sináptica, la excitabilidad de la membrana, la morfología y conectividad neuronal.

La investigación en torno a la participación de las neurotrofinas endógenas (en especial el BDNF) en la generación y modulación de la LTP así como en la reorganización estructural de las sinapsis, ha experimentado en años recientes un auge considerable (Schuman, 1997; Chen et al., 1999; Lu & Chou, 1999; Minichiello et al., 1999; Aoki et al., 2000; Muller 2000, Pang et al., 2004), tratando así de elucidar los mecanismos de acción que subyacen a los cambios en la eficiencia sináptica, implicados en los procesos de aprendizaje y memoria. La inducción de LTP en el giro dentado hipocampal, incrementa los niveles de ARNm de BDNF, NT-3 así como del receptor TrkB (Bramham, et al., 1996; Morimoto et al., 1998). Cepas de ratón carentes del gen que codifica la expresión de BDNF, exhiben una disminución significativa en la expresión de LTP hipocampal (Korte et al., 1995; Patterson et al., 1996).

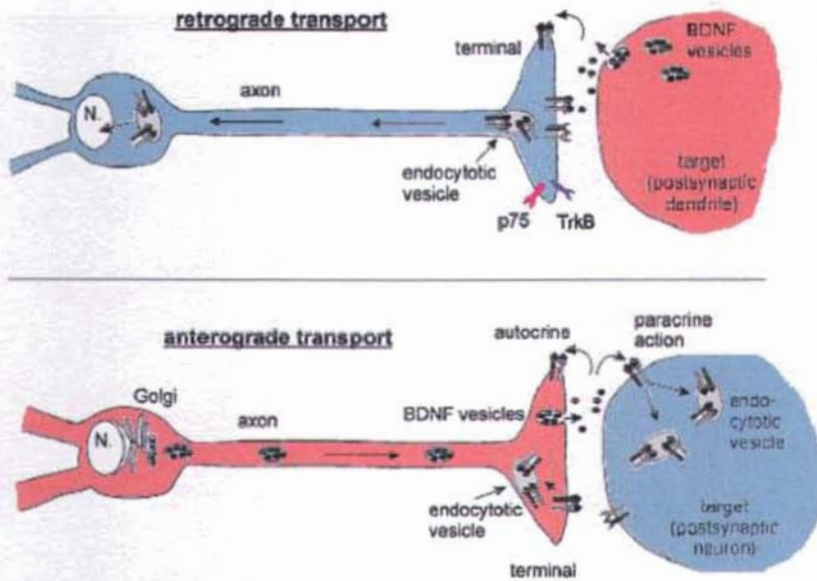
### **1.1.2 Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF)**

El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) es una molécula neurotrófica, cuyo peso molecular es de 27 kDa, y fue originalmente aislada a partir del cerebro del cerdo. Hoy en día sabemos que forma parte del SNC de los mamíferos, en particular en el hipocampo y la neocorteza. Después de haberse aislado la molécula de 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 (Boultos et al., 1993).

Una propiedad fundamental de los blancos del BDNF es que se ubican o proyectan hacia algún 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 BDNF que NGF (Escobar, 1994). Estudios que utilizaron hibridación in situ (utilizada para localizar la presencia de RNA mensajero de una molécula en un determinado lugar) han revelado la distribución del BDNF en el hipocampo. De acuerdo a estos estudios se ha encontrado la presencia de BDNF en el estriado 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 gran

difusión) (Boultos et al., 1993). La regulación de los niveles de BDNF depende de la actividad neuronal, principalmente en el hipocampo y la neocorteza, así como algunas partes del tejido periférico (aunque en menor cantidad) como el corazón, riñón y timo (Boultos, 1993). El BDNF influye en el desarrollo de los patrones de conexión y en el crecimiento de las dendritas en la corteza cerebral (Aoki et al., 2000).

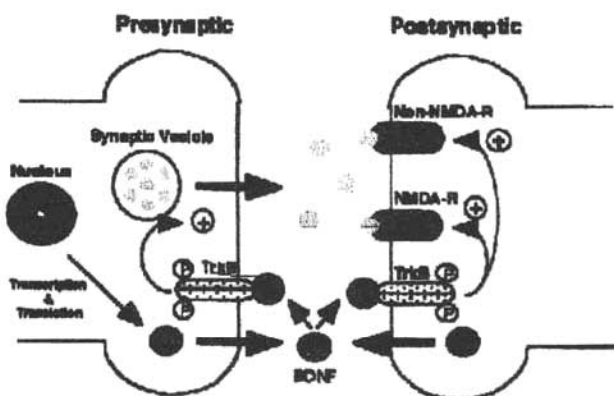
Originalmente se pensaba que el BDNF era transferido de la célula postsináptica a la presináptica (Bartheld et al., 1994; Bartheld et al., 1996; Mowla et al., 1999; Farhadi et al., 2000; Collin et al., 2001), sin embargo, evidencias recientes, muestran como puede ser igualmente transferido de manera anterógrada (de manera similar a la comunicación vía neurotransmisores) (Altar et al., 1997; Johnson et al., 1997; Bartheld & Butowt, 2000; Kohara et al., 2001; Lessmann et al., 2003) (Figura 2).



**Figura 2.** Representación esquemática del transporte retrógrado y anterógrado del BDNF.

Tomado de Lessmann et al., 2003

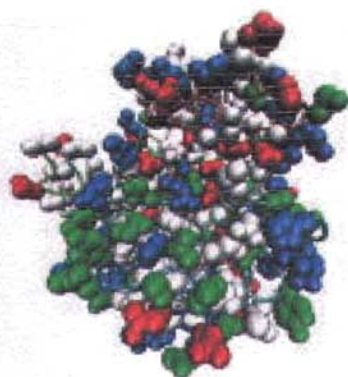
Hoy en día se conoce que el BDNF ejerce acciones tanto presinápticas como post-sinápticas, por ejemplo, a nivel presináptico la activación de su receptor TrkB aumenta la liberación de neurotransmisor de las terminales presinápticas (Lessmann & Heumann, 1998; Li et al., 1998; Lynch, 2004), y de manera postsináptica, el BDNF incrementa la frecuencia de los potenciales post-sinápticos excitatorios (PPSE) miniatura y aumenta la facilitación de los pulsos pareados en cultivos hipocampales (Lohof et al., 1993; Levine et al., 1995; Stoop & Poo, 1996; Gottschalk et al., 1998; Lynch, 2004); (Figura 3).



**Figura 3.** Cascada molecular originada por la unión del BDNF a su receptor TrkB (Yamada & Nabeshima, 2003).

Como se mencionó anteriormente, el BDNF interactúa con su receptor de alta afinidad llamado TrkB (Figura 4). La cascada de señalización que desencadena esta interacción incluye, la mayoría de las veces, a una cascada de proteínas cinasas, las cuales se caracterizan por transferir un grupo fosfato a sus substratos, fosforilando a otras cinasas que translocan al núcleo, y esto trae consigo modificaciones en el proceso celular

(Finkbeiner et al., 1997; Patapoutian & Reichardt, 2001; Minichiello et al., 2002; Ying et al., 2002).



**Figura 4** Modelo tridimensional del receptor TrkB.

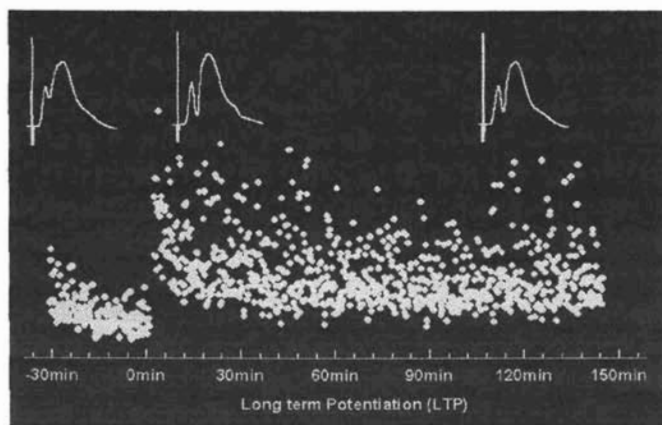
## 1.2 Potenciación de Largo Plazo

La memoria se refleja en la capacidad de las neuronas para modular las respuestas evocadas por un estímulo y para reactivar una respuesta en ausencia del estímulo que la originó (Eichenbaum, 1997). En concordancia con lo anterior es posible considerar ciertos eventos de neuromodulación (entendida como la habilidad que presentan las neuronas para alterar sus propiedades eléctricas en respuesta a 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 partir de redes neuronales, cuyas neuronas se comunican mediante sinapsis. La sinapsis es considerada debido a sus características, como el lugar en el que se efectúan las modificaciones que conducen al almacenamiento de información. Donald Hebb (1949) postuló que, “cuando el axón de un célula A está lo suficientemente cerca para

excitar a una célula B y repetida o persistentemente toma parte en su activación, algún tipo de proceso de crecimiento o cambio metabólico tiene lugar en alguna de las dos células, de modo que la eficiencia de A para activar a B se incrementa". Se considera que el postulado de Hebb se ve representado por la LTP, la cual se define como el incremento prolongado de la eficiencia sináptica, representada como una mayor amplitud y/o pendiente de los potenciales postsinápticos excitatorios (PPSE), debido a la estimulación repetitiva (de alta frecuencia) de las fibras aferentes a un área determinada del sistema nervioso. La LTP representa una forma ubicua de plasticidad sináptica, que se presenta en la mayoría de las sinapsis excitatorias en el SNC.

Este fenómeno (LTP) fue reportado por primera vez en 1973 por Bliss y Lomo, ellos encontraron que al aplicar breves trenes de alta frecuencia a las aferentes excitatorias del hipocampo se originaba un fortalecimiento de la transmisión sináptica (es decir, un incremento en la pendiente de los PPSE) que podía durar por horas y aún por días en animales intactos (Bliss & Lomo, 1973) (Figura 5). Desde entonces, la LTP se ha convertido en el modelo experimental más utilizado para examinar los mecanismos sinápticos del aprendizaje y de memoria.



**Figura 5** Imagen representativa de la LTP hipocámpica (Bliss & Lomo, 1973)

### 1.2.1. Características de la LTP

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 e inclusive molecular subyacen 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 fibras presinápticas, de tal modo que se logre la estimulación necesaria para activar la LTP. Finalmente, la asociatividad se ha observado cuando una vía que ha sido estimulada por una señal de baja frecuencia puede ser potenciada si se activa al mismo tiempo que otra vía estimulada por una señal de alta frecuencia, siempre y cuando ambas sean convergentes a la misma área (Bliss & Collingridge, 1993) (Figura 6)



**Figura 6.** La LTP exhibe cooperatividad, asociatividad y especificidad. Modificado de Bear, 2002)



Para Hebb, la memoria debía ser almacenada a través de la formación de conexiones asociativas entre las neuronas involucradas, sin embargo, se ha observado la existencia de eventos de LTP descritos como no asociativos. La LTP que requiere una activación coincidente de los elementos pre y postsinápticos es llamada LTP hebbiana, mientras que aquella que requiere la activación de cualquiera de dichos elementos es referida como no-hebbiana (Urban & Barrionuevo, 1996).

### 1.2.2 LTP y aprendizaje

La LTP se ha definido como el modelo celular más aceptado para el almacenamiento de información en mamíferos (Hall, 1992; Kandel & Hawkins, 1992; Bliss & Collindridge, 1993; Malenka, 1994; Martinez & Derrick, 1996). La relación de este fenómeno con los procesos de almacenamiento de información ha sido profundamente estudiada en el hipocampo y en otras regiones del SNC, como la neocorteza. 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 redes de neuronas que se han visto involucradas con procesos de aprendizaje y memoria (hipocampo, amígdala, neocorteza, etc.), tiene una duración prolongada y funciona de manera similar al postulado de Hebb (Martinez & Derrick, 1996; Shors & Matzel, 1997).

Los argumentos a favor de una relación causal entre la LTP y la memoria se basan principalmente en que la disrupción de ciertos requerimientos moleculares para el establecimiento y mantenimiento de la potenciación de largo plazo, también producen deficiencias en la solución de ciertas tareas. Se ha encontrado que el uso de bloqueadores de los receptores NMDA en el hipocampo, cuya actividad es necesaria para la inducción de LTP en vías hipocampales, produce déficits en el aprendizaje de las tareas de tipo espacial (Morris et al., 1986; Davis et al., 1992); mientras que el bloqueo de estos receptores en la amígdala, impide el aprendizaje en la tarea de inhibición latente (Cheng Liang et al., 1994) y la adquisición del condicionamiento al miedo (Kim & McGaugh, 1992), y administrado en la corteza insular se traduce en deficiencias en la adquisición de tareas espaciales y del condicionamiento aversivo a los sabores (Gutiérrez et al, 1999).

El bloqueo de la actividad de otras proteínas necesarias para el establecimiento y/o mantenimiento de la potenciación de largo plazo, tales como las proteínas cinasas PKA, PKC y CaMKs, 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 prolongados, la consolidación de la información es dependiente de la transcripción de proteínas (Davis & Squire, 1984; Matthies, 1989) tanto en invertebrados (Montarolo et al., 1986; Tully, 1991) como en mamíferos (Davis & 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 regulación 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). Así mismo, se requiere de la activación de la expresión de genes dependientes del factor de transcripción CREB (cAMP responsive element binding protein), 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).

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 & Schinnick-Gallagher., 1997; Rogan et al., 1997). 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 aprendizaje (Maren, 1996). 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. Se encontraron modificaciones en la facilitación ante pulsos pareados y la oclusión de LTP en secciones obtenidas de animales entrenados, ambos asociados a la ocurrencia de LTP. El éxito de estos estudios se debe en parte a la mayor sencillez de la tarea y a la mejor caracterización del circuito sináptico del flujo de información durante la adquisición de la tarea. De manera muy similar, en 1998 Rioult-Pedotti et al., demostraron que la corteza motora primaria de ratas adultas presentaba un cambio en la eficiencia sináptica debido a una tarea de aprendizaje de habilidad motora

(motor skill learning). Las investigaciones descritas anteriormente representan evidencias a favor de la hipótesis de que durante el aprendizaje existen incrementos en la eficiencia sináptica de manera similar a la LTP.

### **1.2.3. Mecanismos moleculares**

Los mecanismos moleculares que subyacen al establecimiento y mantenimiento de la LTP han sido ampliamente estudiados en las vías hipocampales, particularmente en la vía de las colaterales de Schaffer en la región CA1. Las vías excitatorias en el hipocampo, como en muchas otras zonas del sistema nervioso, utilizan glutamato como neurotransmisor (Kennedy & Marder, 1992).

Los receptores en las terminales postsinápticas que responden a glutamato pueden clasificarse en: receptores metabotrópicos, en los que la activación da lugar a cascadas de traducción en el interior de la célula; y en receptores ionotrópicos, los que al ser activados son permeables a iones que ingresan a la célula. Los receptores ionotrópicos se pueden clasificar en tres tipos de acuerdo con la activación selectiva de ellos ante distintos agonistas de glutamato: los receptores que responden a kainato, denominados kainicos; los que responden a  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxaso-lepropionato (AMPA) y los que son activados por N-metil-D-aspartato (NMDA).

Los receptores NMDA se han asociado con el fenómeno de la LTP. Experimentos realizados utilizando antagonistas, como el AP5 de estos receptores que impiden su activación, evitan la inducción de la 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, este neurotransmisor activa los receptores AMPA de la célula postsináptica, dando lugar a la entrada de sodio al interior de la célula. Los receptores NMDA, también responden a glutamato, pero se encuentran bloqueados por magnesio, lo que impide el intercambio iónico a través de ellos. Para eliminar este bloqueo, es necesario la depolarización de la membrana, lo que ocurre por la entrada de iones a través de otros canales como los tipos AMPA (Nowak et al., 1984; Crunelly & Mayer, 1984). Esto otorga a los receptores NMDA la propiedad de funcionar como detectores de la coincidencia, ya

que se activan solo cuando se parea la actividad de la célula presináptica y la depolarización de la membrana en la célula postsináptica (Bliss & Collingridge, 1993; Malenka, 1994).

Los receptores NMDA tienen además la característica de que al ser activados permiten no solo la entrada de iones de sodio al interior de la célula, sino que también son permeables al calcio, (MacDermott et al., 1986; Jahr & Stevens, 1987; Ascher & Nowak, 1988). Es la entrada de calcio a través de estos canales, y posiblemente a través de los canales de calcio dependientes de voltaje, lo que hace posible que ocurra la LTP, al provocar cambios en el interior de la célula.

En presencia de quelantes de calcio como BAPTA o EGTA, la activación de los receptores NMDA no produce una potenciación de largo plazo (Lynch et al., 1986). Sin embargo, el bloqueo de los canales NMDA o de la entrada y/o uso de calcio, no impide la expresión de la potenciación de largo plazo cuando ha sido previamente inducida (Malenka & Nicoll, 1993). La entrada de calcio al interior de la célula postsináptica, a través de los receptores NMDA, activa a la proteína citosólica llamada calmodulina, que funciona como una señal al activar distintas vías de traducción en el interior de la célula, haciendo posible el mantenimiento del incremento en la eficiencia de la comunicación sináptica por periodos de tiempo prolongados, independientemente de los niveles de calcio (Kennedy & Marder, 1992).

En 1989, Robert Malenka et al. demostraron la importancia de las proteínas cinasas (que se caracterizan por transferir grupos fosfato a sus sustratos) en la potenciación de largo plazo. Encontraron que la LTP se bloquea con la introducción de inhibidores de la actividad de las proteínas cinasas. Además, que el mismo bloqueo se obtiene con el uso de inhibidores específicos de las proteínas cinasas dependientes de calcio.

Kennedy et al. (1990) mostraron el papel central que juega la proteína CaM-KII (calcium-calmodulin-dependent kinase II); mediante la introducción de antagonistas de esta proteína. Estos resultados fueron apoyados por experimentos realizados en ratones transgénicos en los que el gen codificador de esta proteína no era funcional. Sin embargo, el papel que la proteína CaM-KII desempeña en el incremento de la eficiencia sináptica, fue apenas descrito en 1997 (Barria et al., 1997), al demostrarse que su activación 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 LTP que permiten su mantenimiento al menos en el mediano plazo.

#### *Transcripción de proteínas*

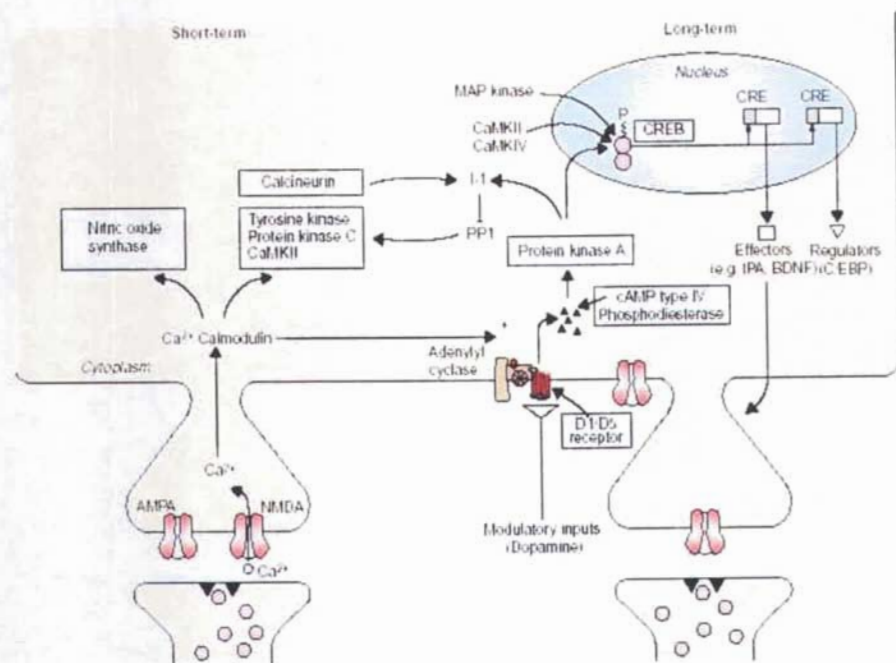
Se ha demostrado que el mantenimiento de la LTP por periodos prolongados (mayores de una hora) es dependiente de la transcripción de proteínas (Nguyen et al., 1994). Si se bloquea la transcripción de mRNA o la traducción a proteínas, el efecto de potenciación decae después de una hora; sin embargo, si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

La búsqueda de cuáles son los genes que cambian sus patrones de expresión como resultado de la inducción de LTP, ha reportado algunos avances. Fazeli et al., (1990) compararon los genes obtenidos mediante electroforesis de tejidos en los que se había inducido LTP con tejidos ingenuos. Encontraron algunas diferencias entre los dos grupos, sus resultados mostraron que la inducción de LTP no solo provoca el aumento en la producción de ciertas proteínas, sino también la inhibición de la producción de otras en las células nerviosas. Esta aproximación sin embargo tiene la desventaja de que es técnicamente difícil establecer la identidad de los genes sobre-regulados o subregulados.

La mayoría de las investigaciones se han centrado en cambios, en el estudio de la expresión de genes específicos basándose en resultados reportados anteriormente, que lleven a la sospecha de que podrían ser influenciados por la estimulación tetánica. Esto ha llevado a que se conozcan algunos aspectos de los mecanismos que permiten la modificación de la transcripción genética luego de la aplicación de estimulación tetánica.

La entrada de calcio, por intermediación de la proteína calmodulina, causa entre otras cosas, la activación de la glicoproteína adenil ciclasa; esta proteína produce AMP cíclico a partir de moléculas de ATP (Kennedy & Marder, 1992). Este nucleótido es utilizado como mensajero en un sinnúmero de cascadas de transducción celulares, desde formas unicelulares hasta los vertebrados. Durante la inducción de la potenciación de largo plazo, el AMP cíclico (cAMP) producido, activa a la proteína cinasa PKA. Huang et al., (1994) mostraron que la potenciación de largo plazo decae si la actividad de esta proteína

es bloqueada. Estos resultados fueron confirmados por experimentos en los que se alteró genéticamente la actividad de la proteína (Abel et al., 1997). Al ser activada la proteína PKA ocurre la disociación de su unidad regulatoria de la catalizadora permitiendo la entrada de la segunda al interior del núcleo (Hagiwara et al., 1993). Una vez en el interior, transfiere grupos fosfatos para la activación del factor 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, denominados CRE (cAMP responsive element) (Silva et al., 1998). En ratones en donde CREB había sido inhibido genéticamente se observaron deficiencias en la capacidad de las preparaciones para expresar LTP por periodos prolongados (Silva et al., 1998) (Figura 7).



**Figura 7.** Mecanismos moleculares de transcripción genética en la potenciación de largo plazo (Abel & Lattal, 2001).

Entre los genes regulados por la activación del factor de transcripción CREB se encuentran los receptores a glutamato tipo AMPA. Nayak et al. (1998), examinaron los niveles de transcripción de estos receptores, y encontraron que la producción de estos aumenta después de la inducción de LTP, utilizando la activación de la vía de transducción de la cinasa PKA; sin embargo, la transcripción de receptores NMDA no se ve modificada.

#### **1.2.4. BDNF y LTP**

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 podrían constituir la conexión entre el incremento en la eficiencia sináptica y las modificaciones estructurales en los sitios sinápticos que se han observado tras la inducción de LTP (Edwards, 1995). Aunado a lo anterior se ha reportado 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, 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). Se ha reportado que la adición de BDNF 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 & Schuman, 1995).

Las investigaciones que han utilizado combinaciones de métodos fisiológicos e inmunoquímicos han sido útiles para deslindar la participación del BDNF sobre la plasticidad sináptica, traducido en el fenómeno de potenciación a largo plazo (LTP), y sus efectos asociados a la memoria. Se ha sugerido que el BDNF tiene un papel instructivo en la conexión sináptica ya que parece dar inicio a procesos involucrados en la estabilidad de la fuerza sináptica (Patterson et al., 2001). Recientemente se han demostrado que la

aplicación de BDNF exógeno aumenta la eficiencia sináptica debido al incremento de la liberación de glutamato en la sinapsis excitatoria (Kang y Schuman, 1995; Carmignoto et al., 1997; Lessmann & Heumann, 1998; Li et al., 1998<sup>a</sup>; Bradley & Sporns, 1999; Schinder & Poo, 2000; Taniguchi et al., 2000; Paul et al., 2001; Lessmann et al., 2003; Aicardi et al., 2004). Se ha señalado una necesaria participación del BDNF durante el mantenimiento de la LTP (Figurov et al., 1996; Patterson et al., 2001). Por ejemplo, se ha demostrado que 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). El BDNF modula la transmisión sináptica y la LTP a corto plazo en las vías colaterales de Schaffer (Patterson et al., 1996). Esta serie de investigaciones sugieren que el BDNF juega un papel importante en la plasticidad a largo plazo en ratas adultas (Schinder & Poo, 2000).

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). Se ha demostrado que las ratas al aprender la tarea espacial del laberinto de agua de Morris muestran un incremento en la traducción de la señal para BDNF y un acoplamiento sináptico de la proteína sinapsina I en el hipocampo (Gómez-Pinilla et al., 2001). Esto indica que el BDNF es importante para la función sináptica durante el aprendizaje en las tareas conductuales (Jankowsky & Patterson, 1999). Por otra parte 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 quantal del neurotransmisor e incrementa el número de vesículas ancladas en la zona activa, en el hipocampo (Tyler & Pozzo-Miller, 2001).

### **1.2.5. LTP en la Neocorteza**

Si bien se tiende a considerar a la neocorteza como el lugar donde tiene su 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 de células y las vías aferentes presentan una mayor segregación, lo cual dificulta la



interpretación de los registros de campo, así como la inducción de PPSE de una vía aferente bien definida (Bounomano & 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 del animal y la capacidad de inducción de la LTP, así como la necesidad de ampliar la gama de frecuencias y el número de estimulaciones tetánicas. Por ejemplo, si en el hipocampo basta con la aplicación de estímulos 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 & Kirkwood, 1993).

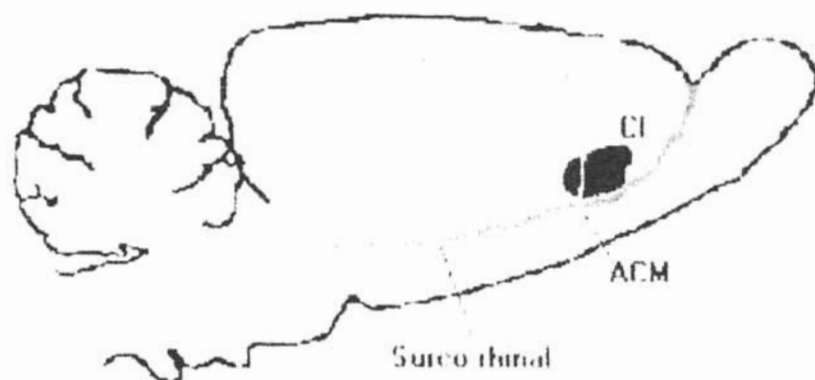
No obstante éstas complicaciones, la presencia de LTP en la neocorteza es un hecho comprobado y cada día se incrementa el número de regiones en las que ha sido posible inducirla, como la neocorteza visual primaria de gato (Komatsu et al., 1981, 1988) y rata (Artola & Singer, 1990; Akaneya et al., 1997; Carmignoto et al., 1997; Ying et al., 2002), la neocorteza somatosensorial en gato (Lee et al., 1991), corteza motora en gato (Keller et al., 1990) y en rata (Riout-Pedotti et al., 2000), la corteza prefrontal en rata (Hirsch & Crepel, 1990) y recientemente en la corteza insular en rata (Escobar et al., 1998a). De manera simultánea, la caracterización anatómica y fisiológica de las vías que confluyen a la neocorteza facilita de manera importante este trabajo.

### **1.3. Corteza Insular**

#### **1.3.1. Descripción de la Corteza Insular**

La corteza insular (CI), es un área neocortical ubicada en la corteza temporal adyacente al surco rhinal, alrededor de la arteria cerebral media, en ratas comprende un área de aproximadamente 3mm x 1mm (Braun et al., 1982; Lasiter et al., 1982; Kiefer, 1985). 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 CI agranular se

fusiona imperceptiblemente con la corteza perirhinal (Paxinos & 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) (Figura 8).



**Figura 8.** Esquema que muestra la ubicación de la corteza insular en el cerebro de rata.

CI = corteza insular, ACM = arteria cerebral media.

Cuando se describió en un principio, se le llamó corteza gustativa o visceral, ya que recibe información tanto gustativa como visceral del tálamo. Ha resultado de gran interés no solo 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 & Everitt, 1988; Escobar et al., 1989; Bermúdez-Rattoni & McGaugh, 1991; Rosenblum et al., 1993; Yamamoto et al., 1994).

### 1.3.2. Aferencias gustativas a la corteza insular

En la actualidad se cuenta con información bastante precisa que nos describe cuál es el recorrido anatómico que siguen los estímulos gustativos de la periferia hacia la neocorteza, basándose en estudios anatómicos, electrofisiológicos y conductuales. Todo comienza cuando un sabor es detectado por los receptores gustativos de la boca y transmitido hacia la porción anterior del núcleo del tracto solitario (NTS) en el tallo cerebral, vía los nervios craneales facial (VII) y glosofaríngeo (IX) principalmente y de manera secundaria por el vago (X). El segundo relevo del estímulo gustativo se ubica en el núcleo parabraquial del puente, en lo que se ha denominado área gustativa del puente (Pontine Taste Area, en inglés; PTA). Una vez aquí, se reconocen dos rutas a seguir: en su mayoría, las aferencias del PTA se dirigen a estructuras ventrales del cerebro basal, como son la amígdala, la zona lateral del hipotálamo y la sustancia innominata; la segunda ruta se dirige al complejo ventrobasal del tálamo, el cual se comunica con la corteza insular (Travers, 1993). Lasiter et al. (1982) describen mediante el empleo 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.

Para tener un marco de referencia más amplio respecto al tipo de información que procesa la CI, resulta importante destacar que nuestro primer relevo en este circuito (el NTS) recibe también señales muy importantes provenientes de la rama hepática del vago así como señales del área postrema y del sistema vestibular. Estas señales proveen información relacionada con irritación por intoxicación estomacal, intoxicación sanguínea y sensación de náusea, respectivamente, las cuales llegan a la CI, por lo cual se le ha denominado corteza visceral. Además, se debe 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 & Price, 1974; Escobar et al., 1989; Bermúdez-Rattoni & McGaugh, 1991) (Figura 9). A partir de



**Figura 9.** Vías de las aferencias gustativas hacia la corteza insular (Modificado de Yasoshima & Yamamoto, 1998).

esto ha sido posible considerar a la CI como una estructura fundamental en los procesos de integración y almacenaje de información gustativo-visceral, capaz de dirigir conductas motivadas por este tipo de información, como la evitación o aceptación de un alimento dependiente de una experiencia gustativa previa (Kiefer, 1985; Bermúdez-Rattoni & McGaugh, 1991).

### **1.3.3. Paradigmas de aprendizaje involucrados en la actividad de la corteza insular**

Debido a su función integradora de estímulos gustativos y viscerales, los primeros estudios referentes a la memoria en la CI abordaban 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 su malestar y aprende a no ingerir nuevamente nada que posea ese mismo sabor. En el CAS se asocia una irritación gástrica provocada, por ejemplo, por cloruro de litio (Li), a un sabor determinado, de manera que cuando el animal prueba nuevamente aquel sabor, presentará una respuesta de rechazo al asociarlo con el malestar. Los sustratos anatómicos utilizados en el aprendizaje del CAS han sido bien establecidos (Braun et al., 1982; Kiefer, 1985).

La CI ha sido implicada en la adquisición y almacenamiento de diferentes tareas de aprendizaje tales como el CAS, laberintos espaciales y la prevención pasiva (Escobar et al., 1989; Bermúdez-Rattoni & McGaugh, 1991; Bermúdez-Rattoni et al., 1995). En este sentido se ha demostrado que las lesiones bilaterales en la CI afectan la adquisición y retención del CAS (Yamamoto et al., 1980; Brown et al., 1982; Kiefer et al., 1982; Lasitier et al., 1982; Kiefer et al., 1984; Dunn & Everitt, 1988; Kiefer et al., 1988; Bermúdez-Rattoni & McGaugh, 1991; Kiefer & Morrow., 1991; Kiefer & Orr, 1992; Schafe & Bernstein, 1998). Debido a que las lesiones en la CI no producen deficiencias en la sensibilidad gustativa o gastrointestinal, se ha sugerido que estas lesiones afectan la representación mnémica de los sabores y sus consecuencias gastrointestinales (Kiefer, 1985).

En estudios similares se ha observado que al combinar lesiones bilaterales en 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 el recuerdo de esta tarea.

Lesiones con NMDA en la región caudal de la CI afectan el aprendizaje en el laberinto de agua de Morris, mientras que si las lesiones se realizan en la región central se afectan tanto el laberinto de agua como el CAS, lo que sugiere que la CI presenta una

funcionalidad heterogénea (Nerad et al., 1996). Se ha observado que las lesiones en la CI también dañan la adquisición del condicionamiento inmunosupresor (Ramírez-Amaya et al., 1996). Estudios recientes han demostrado que la actividad noradrenérgica de la corteza insular es necesaria durante la adquisición del CAS (Barman et al., 2000; Bermúdez-Rattoni et al., 2004).

#### **1.4. Consideraciones generales acerca del aprendizaje y la memoria**

Las investigaciones que tienen por objeto encontrar el cómo es que se almacena la 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 & Connors, 2001). Por definición, el aprendizaje es el proceso por el cual adquirimos información, mientras que la memoria es el proceso por el cual la información es almacenada. La memoria implica cambios funcionales y estructurales en las sinapsis de los circuitos involucrados. La consolidación es un término que denota estabilización del proceso de memoria a diferentes niveles de la organización cerebral. Requiere de síntesis proteica (Dudai, 2004).

Desde Aristóteles, los filósofos occidentales han pensado tradicionalmente que el aprendizaje se logra a través de la asociación de ideas. Un paradigma clásico de aprendizaje que concuerda con esta aseveración es el condicionamiento clásico. El condicionamiento clásico fue introducido en el estudio del aprendizaje a principios del siglo 20 por Ivan Pavlov. La esencia es la asociación entre dos estímulos (estímulo condicionado y el estímulo incondicionado).

Cuando se presenta el estímulo condicionado reiteradamente en ausencia del estímulo incondicionado se presenta un fenómeno que se conoce como extinción. Podemos definir la extinción como una modificación en la representación interna de la asociación condicionada que permite la supresión de la respuesta condicionada, debido a un reajuste del significado conductual en la relación entre la asociación previa del estímulo o el estímulo/respuesta (Dudai, 2004). Evidencias conductuales indican que la extinción experimental no envuelve eliminación del trazo original, pero sí conlleva un proceso de re-

aprendizaje (Berman, 2003). La extinción tiene como resultado la formación de una nueva representación interna que se externaliza a través del comportamiento (Berman, 2003).

## **1.5. Condicionamiento Aversivo a los Sabores**

Desde hace más de un siglo se conoce la existencia del condicionamiento aversivo a los sabores (CAS), sin embargo es hasta 1955 cuando John Garcia formaliza este paradigma de aprendizaje en el contexto de la neurobiología, lo cual convierte a García en el precursor de una línea de investigación que ha superado sus expectativas iniciales, mostrándonos nuevos aspectos de los procesos del aprendizaje y memoria (Bures, 1998).

Es indispensable que cada ser vivo aprenda y recuerde qué lo nutre y qué lo enferma. Resulta claro percatarse de la importancia evolutiva que ha tenido el desarrollo de los mecanismos neuronales sumamente especializados capaces de controlar de modo eficiente la ingesta de los alimentos y las consecuencias que éstos tengan para cada organismo (Bures, 1998). Lo que hasta la fecha se conoce con respecto a este punto es la estrecha asociación entre los estímulos viscerales y los estímulos externos. Es de esperarse que si un estímulo externo es asociado a una sensación de malestar físico la respuesta adecuada sea evitar ese estímulo. En uno de sus primeros trabajos, García y Koelling (1966) observaron que, al parecer, sólo el apareamiento entre sensaciones gustativas con agentes causantes de irritación gástrica y náusea, eran capaces de establecer y reforzar una conducta aversiva hacia determinados sabores, mientras que en asociaciones con estímulos audiovisuales la conducta no se mantenía; esto permitió pensar que la sensación de náusea es importante para establecer el CAS por mayor tiempo.

Actualmente se reconocen dos vías importantes para la formación de las sensaciones de malestar o emesis: cuando el estímulo que la origina proviene de una irritación gástrica, la señal se conduce por el nervio vago hacia el NTS y de aquí se proyecta finalmente al centro emético, situado en la formación reticular. La otra vía se establece con la presencia de toxinas en la sangre, que al ser detectadas por la región quimiosensitiva del área postrema, inicia el reflejo emético. En ratas vagotomizadas se ha observado que la aversión es débil cuando se induce por irritación gástrica y que ésta se extingue rápidamente, resaltando así la importancia que tiene la asociación entre los

síntomas de malestar físico (náusea, dolor, vómito, diarrea) y el sabor de las sustancias ingeridas para la adquisición y mantenimiento del CAS (Kiefer, 1985). Entre las características que convierten al CAS en un valioso paradigma de aprendizaje, se encuentran: el conocimiento que se tiene de las principales estructuras involucradas en la transferencia y asociación de los estímulos que inducen al CAS y la factibilidad y ubicuidad del efecto conductual (Kiefer, 1985).

Entre las similitudes que presenta el CAS con respecto al condicionamiento clásico, es posible mencionar su tendencia a generalizar (la aversión a un sabor se extiende a otros alimentos o sustancias con sabores muy 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 suele ser resistente), y que el condicionamiento es muy fuerte cuando el estímulo condicionado es novedoso. Cuando por experiencias previas el organismo reconoce a un estímulo condicionado como seguro, el desarrollo de la respuesta condicionada ante este estímulo se ve retardada y este fenómeno es conocido como inhibición latente. Algunas de las características más importantes del CAS son su selectividad hacia los estímulos gustativos, el que un solo entrenamiento basta para obtener una fuerte respuesta aversiva ante un sabor novedoso, y algo muy peculiar es el que sea posible la asociación entre el estímulo condicionado (EC) y el estímulo incondicionado (EI) cuando entre ambos median tiempos bastante amplios, desde minutos hasta horas (Bernstein, 1991).

Es sobresaliente esta peculiaridad del CAS con respecto a la temporalidad entre la presentación del EC y el EI. Bures (1998) postula la formación de una 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 al EI y formar la memoria gustativa a largo plazo.

La formación de la memoria de largo plazo de CAS requiere de múltiples mecanismos neuromodulatorios y señales de transducción en la CI (Naor & Dudai, 1996; Rosenblum et al., 1997; Berman et al., 1998; Berman et al., 2000). Esto involucra a receptores colinérgicos, glutamatérgicos,  $\beta$ -adrenérgicos, así como a la cascada de MAPK (mitogen associated protein kinase) (Berman & Dudai, 2001; Dudai, 2004).



Experimentos recientes han reportado que igual que la consolidación, la extinción a largo plazo del condicionamiento aversivo a los sabores (CAS) requiere de nueva síntesis de proteína en la corteza insular (Berman & Dudai, 2001; Berman, 2003). En ausencia de un entrenamiento de extinción, el aprendizaje adquirido a través del CAS puede durar hasta meses sin decremento significativo (Berman, 2003).

### **1.5.1. La amígdala y el CAS**

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

La amígdala ha sido relacionada frecuentemente con las funciones emotivas, más que con las cognitivas (LeDoux, 1993). Se ha observado que la estimulación de diferentes áreas de la amígdala se vincula a cambios en el sistema nervioso autónomo, en particular a cambios asociados con la expresión de miedo y ansiedad (Davis et al., 1992). Reacciones como el incremento en la presión sanguínea, dilatación de la pupila y 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 & Murray, 1992), como la base neuroanatómica de los cambios neurales que subyacen a la memoria afectiva (Davis et al., 1992) o bien, como una estructura capaz de regular el almacenaje de información en otras regiones cerebrales siempre que sea activada por un estímulo emocional; esto es, que la amígdala es capaz de fortalecer las memorias al relacionarlas con su significado emocional (McGaugh et al., 1990).

Se ha visto que la amígdala es el punto de convergencia de la información proveniente tanto del estímulo condicionado como del estímulo incondicionado en el “foot shock” (Clugnet et al., 1990; Lynch, 2004). Las lesiones en la amígdala han sido asociadas con efectos adversos en la realización de pruebas de aprendizaje como la prevención pasiva

(Liang et al., 1990; McGaugh et al., 1990), la potenciación al reflejo del miedo (Falls et al., 1992), y la prevención activa (Bermúdez-Rattoni et al., 1997).

La evidencia experimental ha logrado establecer un estrecho vínculo entre la amígdala y su participación en el CAS. Richardson (1973) observó que la estimulación de los núcleos basolateral o corticomediales de la amígdala produce inhibición en el consumo de alimentos. Lasiter (1983) demostró la presencia de proyecciones amigdalocorticales entre la neocorteza gustativa y los núcleos lateral y basolateral de la amígdala. En la actualidad es bien conocido que la CI recibe proyecciones directas provenientes 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 & McGaugh, 1991; Miranda & McGaugh, 2004). Así mismo, se ha observado que al lesionar el Bla se altera la respuesta de la aversión al sabor, mientras que las lesiones en el núcleo central de la amígdala no producen un efecto similar (Yamamoto et al., 1995; Morris et al., 1999). Esto sugiere una participación decisiva del Bla en el CAS, lo cual se sustenta aún más si consideramos la interconectividad recíproca y funcional existente entre éste núcleo y la CI (Escobar et al., 1989).

## **1.6. BDNF, LTP, CAS y CI**

Como se expresó en líneas anteriores, la participación de la CI en los procesos de aprendizaje y memoria es decisiva, en particular en pruebas de aprendizaje motivadas aversivamente como el CAS y la prevención pasiva (Escobar et al., 1989; Bermúdez-Rattoni et al., 1995; Bahar et al., 2004). En la actualidad, se tiene un conocimiento claro de las aferencias que recibe esta estructura, siendo de particular interés las provenientes del núcleo basolateral amigdalino (Bla) (Krettek & Price, 1974; Escobar et al., 1989; Bermúdez-Rattoni et al., 1997). Por otra parte, la inducción de la LTP en la amígdala se encuentra bien documentada, y de hecho, existe una clara caracterización del circuito sináptico que participa en el flujo de información durante el condicionamiento al miedo (Maren, 1996; Rogan et al., 1997). Ambas estructuras, la CI y la amígdala contribuyen a la formación y retención de la memoria asociada al malestar gástrico (Bermúdez-Rattoni & McGaugh, 1991; Bermúdez-Rattoni et al., 1997). Recientemente, Escobar et al., (1998a)

lograron inducir la LTP in vivo en la CI mediante la estimulación de alta frecuencia de las aferentes provenientes del Bla, el incremento en la respuesta sináptica de esta vía se conserva por 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 (ácido  $\gamma$ -(2 carboxipiperazin-4-yl)-propil-L-fosfónico) y el MK-801 (maleato de dizocilpina). Resultados similares fueron hallados por Jones et al., (1999). Cabe mencionar el que no fue necesaria la aplicación de inhibidores GABAérgicos para obtener este incremento en la respuesta sináptica. Estos resultados son de particular interés debido a que demuestran que las modificaciones en la eficiencia sináptica dependientes de 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 CI. Recientes investigaciones han demostrado 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).

En virtud de que el BDNF se encuentra ampliamente involucrado en la modulación de expresiones de plasticidad sináptica tales como incrementos de la eficiencia y reorganización 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 altamente probable su participación en los procesos de aprendizaje y memoria (McAllister et al., 1999; Tyler et al., 2002; Yamada et al., 2002). De manera que, 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.

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Este estudio pretende probar la influencia que ejerce el BDNF, sobre los cambios en la fortaleza de la transmisión sináptica que se traducen en el fenómeno de potenciación a largo plazo de la neurotransmisión neocortical in vivo, así como su contribución sobre las funciones cognitivas en las que interviene la neocorteza insular.

lograron inducir la LTP in vivo en la CI mediante la estimulación de alta frecuencia de las aferentes provenientes del Bla, el incremento en la respuesta sináptica de esta vía se conserva por 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 (ácido  $\gamma$ -3-(2 carboxipiperazin-4-yl)-propil-1-fosfónico) y el MK-801 (maleato de dizocilpina). Resultados similares fueron hallados por Jones et al., (1999). Cabe mencionar el que no fue necesaria la aplicación de inhibidores GABAérgicos para obtener este incremento en la respuesta sináptica. Estos resultados son de particular interés debido a que demuestran que las modificaciones en la eficiencia sináptica dependientes de 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 CI. Recientes investigaciones han demostrado 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).

En virtud de que el BDNF se encuentra ampliamente involucrado en la modulación de expresiones de plasticidad sináptica tales como incrementos de la eficiencia y reorganización 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 altamente probable su participación en los procesos de aprendizaje y memoria (McAllister et al., 1999; Tyler et al., 2002; Yamada et al., 2002). De manera que, 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.

## **II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Este estudio pretende probar la influencia que ejerce el BDNF, sobre los cambios en la fortaleza de la transmisión sináptica que se traducen en el fenómeno de potenciación a largo plazo de la neurotransmisión neocortical in vivo, así como su contribución sobre las funciones cognitivas en las que interviene la neocorteza insular.

### III. OBJETIVOS

En virtud de los antecedentes antes expuestos, en el proyecto abordamos:

- 1) El análisis de la participación del BDNF en la generación de la LTP neocortical, en particular de la proyección que va del núcleo basolateral amigdalino a la corteza insular, *in vivo*.
- 2) La exploración de los efectos que tiene ésta neurotrofina sobre las funciones cognitivas efectuadas por la corteza insular, en particular sobre el condicionamiento aversivo a los sabores.
- 3) La caracterización de parte de los mecanismos involucrados en la acción del BDNF sobre expresiones de la plasticidad sináptica neocortical tales como la LTP y el CAS, empleando antagonistas de los receptores TrkB.

### IV. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

El presente estudio consta de dos fases experimentales, cuya metodología general se describe a continuación.

#### 4.1. Metodología general

**4.1.1. Sujetos.** Los sujetos empleados en el presente estudio fueron ratas macho de la variedad Wistar con pesos entre 300 y 350g. Los sujetos experimentales se mantuvieron desde su llegada al bioterio y durante los experimentos, en cajas individuales de acrílico con agua y alimento *ad libitum* (excepto en las fases experimentales que especifiquen lo contrario), y en un ciclo de luz-obscuridad 12:12 hr con una temperatura promedio de 21<sup>0</sup>C.

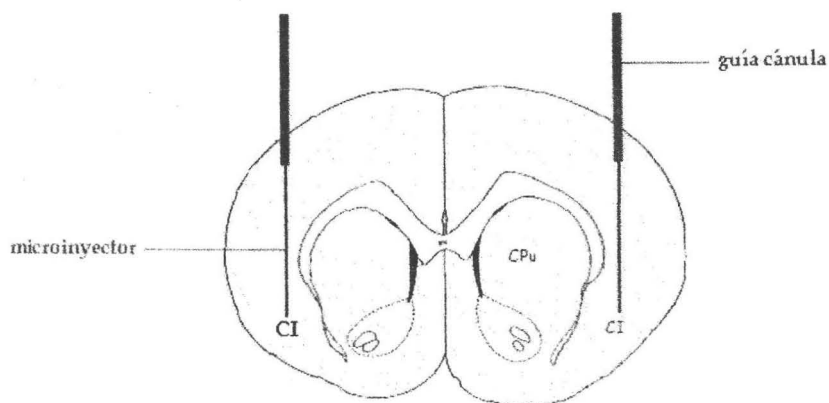
**4.1.2. Electrofisiología.** Durante los procedimientos quirúrgicos y electrofisiológicos, los animales fueron anestesiados con pentobarbital (50 mg/kg IP), suministrando inyecciones suplementarias del mismo (25 mg/kg) a intervalos de 1 hr a fin de mantener los niveles quirúrgicos de anestesia. Las respuestas corticales fueron registradas utilizando un

electrodo monopolar de acero inoxidable (diámetro 0.005", Medwire, Chicago, IL) colocado en la CI (AP +1.2 mm; ML + 5; DV-5.5) Paxinos & Watson (1995). Las respuestas fueron evocadas a través de la estimulación directa de los núcleos amigdalinos, empleando electrodos bipolares de acero inoxidable (diámetro 0.005", Medwire, Chicago, IL) colocados en las coordenadas correspondientes al núcleo basolateral amigdalino (AP - 2.8 mm; ML + 5; DV-8.5) Paxinos & Watson (1995). La estimulación (pulsos monofásicos de 50-70  $\mu$ A y 0.1-0.25 msec de duración) fue suministrada por un estimulador Grass S48. Las respuestas evocadas fueron amplificadas utilizando un amplificador Grass P5 y la señal fue digitalizada para almacenamiento y análisis en una computadora provista de software BrainWave (Datawave Co). La LTP fue analizada a través de la medición de la amplitud y la pendiente de los potenciales postsinápticos excitatorios de campo.

**4.1.3. Canulación.** El procesamiento quirúrgico de los sujetos se llevó a cabo utilizando procedimientos estereotáxicos convencionales, y consistió en la implantación bilateral de guías cánula de acero inoxidable de 1 cm de largo y 0.022 pulgadas de calibre bajo el efecto de anestesia (Nembutal 50 mg/kg; vía intraperitoneal). Las coordenadas empleadas fueron AP = +1.2 mm.; ML =  $\pm$ 5.0 mm.; DV = -2 mm (Paxinos & Watson, 1995). Los extremos de las guías cánula fueron colocadas 5mm arriba de la CI; se fijaron al cráneo usando acrílico dental de secado rápido (Figura 10). Un estilete de alambre de acero inoxidable fue colocado en el interior de las cánulas con el fin de proteger su luz de obstrucciones con material orgánico durante el periodo de entrenamiento. El periodo post-operatorio tuvo una duración de una semana, tras la cual se inició el entrenamiento del CAS.

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 3mm por debajo del extremo inferior de la cánula, alcanzando así la región correspondiente a la CI. Los microinyectores fueron conectados mediante tubos de polietileno a jeringas Hamilton de 10 $\mu$ l. Las microinyecciones fueron dosificadas mediante una bomba de microinfusión (Carnegie Medicine, 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.

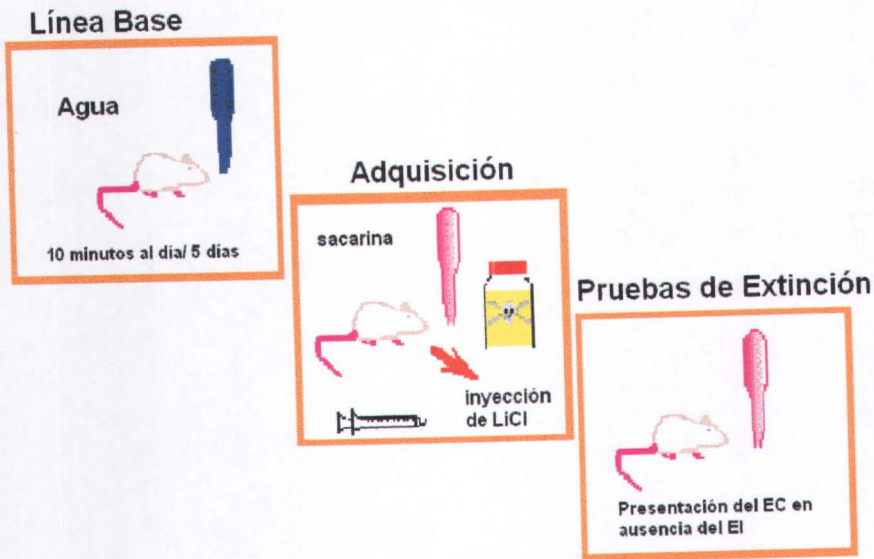


**Figura 10.** Esquema en un corte coronal que muestra la posición de las guías cánulas utilizadas para la infusión de los fármacos dentro de la corteza. CI = corteza insular, Cpu = putamen caudado.

**4.1.4. Condicionamiento Aversivo a los Sabores.** Las ratas fueron privadas de agua durante 24 horas previas al entrenamiento, que consiste en dos sesiones diarias de 10 minutos, durante las cuales las ratas bebían agua *ad libitum*, estas sesiones que constituyen la línea base de los experimentos correspondientes tuvieron una duración de cuatro días. Hacia el quinto día, el agua fue substituida por una solución 0.1% de sacarina seguida 20 min. después de una inyección intraperitoneal de LiCl (0.2M; 9.37ml/Kg), con la finalidad de inducir aversión al sabor. Después de cuatro días más con sesiones de línea base el agua se substituyó nuevamente por una solución de sacarina al 0.1%, para probar la aversión durante la sesión de prueba. El porcentaje de variación con respecto al volumen basal consumido, fue el parámetro a registrar y analizar. En el presente proyecto se emplearon

varias sesiones de prueba, a fin de deslindar los efectos sobre la retención de la tarea (Figura 11).

## Condicionamiento Aversivo a los Sabores



**Figura 11.** Esquemización del procedimiento empleado durante el entrenamiento en el condicionamiento aversivo a los sabores (CAS).

**4.1.5. Histoquímica de Nissl.** Una vez se concluyó 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 solución fijadora de paraformaldehído 4%/ glutaraldehído 0.1% en PBS pH 7.4. Los cerebros fueron extraídos y almacenados para su postfijación en paraformaldehído

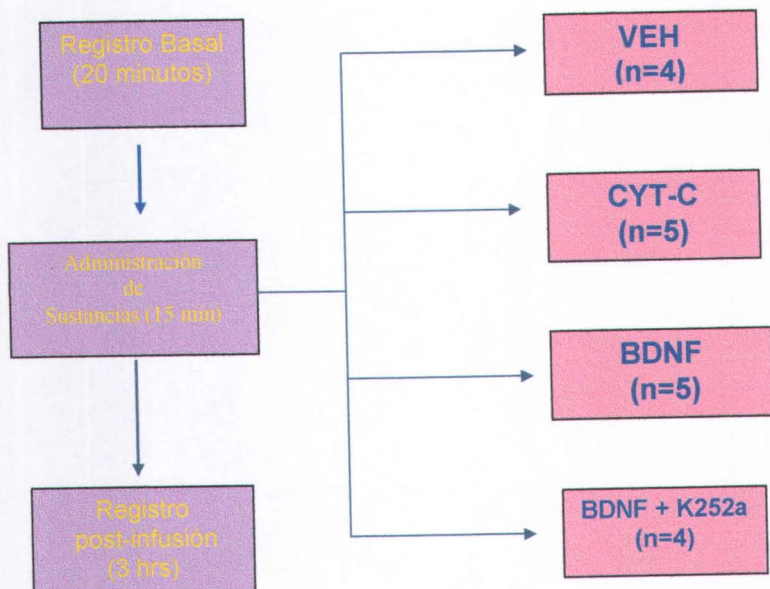


4%/ glutaraldehído 0.1% durante 24 horas a 4°C. Transcurrido este periodo, fueron almacenados en una solución de sacrosa al 30% en PBS hasta que alcanzaron una densidad mayor a la de la solución. Sólo entonces los cerebros fueron congelados y rebanados en cortes coronales de 40 µm. Los cortes se montaron en portaobjetos de cristal bañados de gelatina y cromoalúmina. Las muestras fueron teñidas con violeta de cresillo y examinadas en un microscopio de luz, con el fin de verificar que la posición de la punta del microinyector estuviera en la región correspondiente a la CI.

**4.1.6. Inmunohistoquímica para BDNF.** Una vez se concluyó la fase electrofisiológica del experimento, los animales fueron sacrificados mediante una sobredosis del anestésico pentobarbital. La perfusión se efectuó transcárdinalmente con 100ml de PBS 0.1M (pH 7.6) seguido por 400 ml de paraformaldehído al 4%/glutaraldehído 0.2% en fosfato buffer 0.1M (pH 7.6). El periodo de exposición a los fijadores durante la perfusión fue de 30 min, seguido por un periodo post-fijación de 24 hr a 4°C. Los cerebros fueron entonces transferidos a una solución de sucrosa al 30% en PBS 0.1M (pH 7.6). Secciones coronales de 40µm fueron colectadas en buffer fosfato, e incubadas de 3 – 5 días en el anticuerpo primario, anti-BDNF, (1:500; Sigma) a 4°C. Para revelar el anticuerpo se utilizó el método de inmunoperoxidasa-complejo avidina-biotina, brevemente, las secciones fueron lavadas en PBST e incubadas por 1 hr en el anticuerpo secundario (1:200; Vectastain ABC Elite Kit), lavadas nuevamente e incubadas por 1 hr en el complejo avidina-biotina-peroxidasa. La marca de peroxidasa fue revelada por la reacción con diaminobenzidina (DAB) en 50mM de Tris, pH 7.6/0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [0.6 ml DAB (10mg/ml) 30 ml PBS 0.1 molar y 5 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]. Por último se lavaron tres veces en un solución de PBS al 0.3% Triton X-100 por 20 minutos en cada ocasión. La reacción inmunohistoquímica fue desarrollada usando un equipo Vectastain ABC Elite. Finalmente las secciones fueron montadas en portaobjetos de cristal bañados en gelatina y cromoalúmina, y analizadas al microscopio.

#### **4.1.7. Fase I: Participación del BDNF en la generación de la LTP neocortical**

Con el propósito de analizar la participación de la neurotrofina BDNF en la generación y modulación de la LTP neocortical *in vivo*, empleamos el modelo de LTP de la proyección núcleo basolateral amigdalino a la corteza insular (Blá-CI) que hemos caracterizado recientemente (Escobar et al., 1998a). En esta fase a fin de explorar la generación, sustituimos la estimulación tetánica de alta frecuencia generadora de la LTP en esta proyección, por la administración intracortical de BDNF (3µg/3µl/hemisferio; Alomone Labs, Jerusalem); administrados a través de electrodos de microinfusión consistentes en cánulas de acero inoxidable de calibre 33, recubiertas por epoxilita, acopladas a un tubo de polietileno por medio de un anillo de acero inoxidable bañado con teflón (diámetro de 0.005 pulgadas). El tubo de polietileno fue conectado a una jeringa Hamilton de 10 µl, la cual en su momento fue accionada por una bomba de microinfusión (Carnegie Medicine, MA) a una velocidad de flujo de 1µl/5min. En los grupos control se administraron volúmenes similares a los antes descritos de PBS (3µg/3µl); Citocromo-C, una proteína con características estructurales similares a las del BDNF, pero sin actividad trófica (3µg/3µl; Sigma, St. Louis, MO) y BDNF + K252a, un inhibidor de los receptores Trk, (3µg de BDNF/3µl de K252a a 20 µM; Alomone Labs, Jerusalem) (Figura 12).



**Figura 12.** Diagrama de flujo del procedimiento experimental de la Fase I.

#### 4.1.8. Fase II. Participación del BDNF en el CAS

Durante el análisis de los efectos que la inducción de la LTP dependiente de neurotrofinas tiene sobre las funciones cognitivas efectuadas por la neocorteza cerebral, se emplearon animales provenientes de grupos experimentales similares a los descritos anteriormente. Los animales provenientes de los grupos así procesados fueron entrenados en la tarea de condicionamiento aversivo a los sabores (descrita en la metodología general).

Recientemente se ha sugerido que la LTP contribuye a incrementar la retención de la memoria en algunas tareas conductuales (Izquierdo & Medina, 1995; Escobar & Bermúdez-Rattoni, 2000), por lo que durante la etapa conductual se deslindaron los efectos de las neurotrofinas sobre el aprendizaje y la retención de esta tarea, efectuando para ello

varias sesiones de extinción. En los experimentos conductuales se contó con grupos controles intactos aunados a los experimentales y controles descritos. (Figura 13).

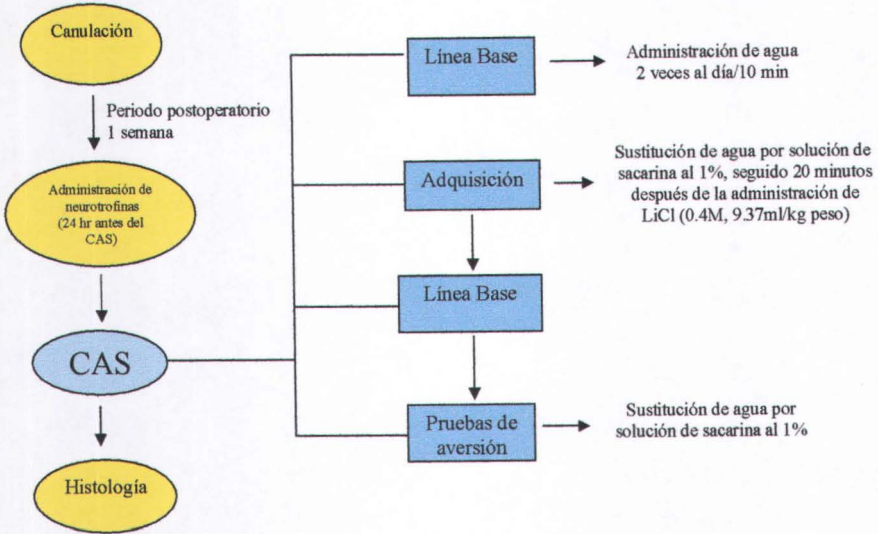


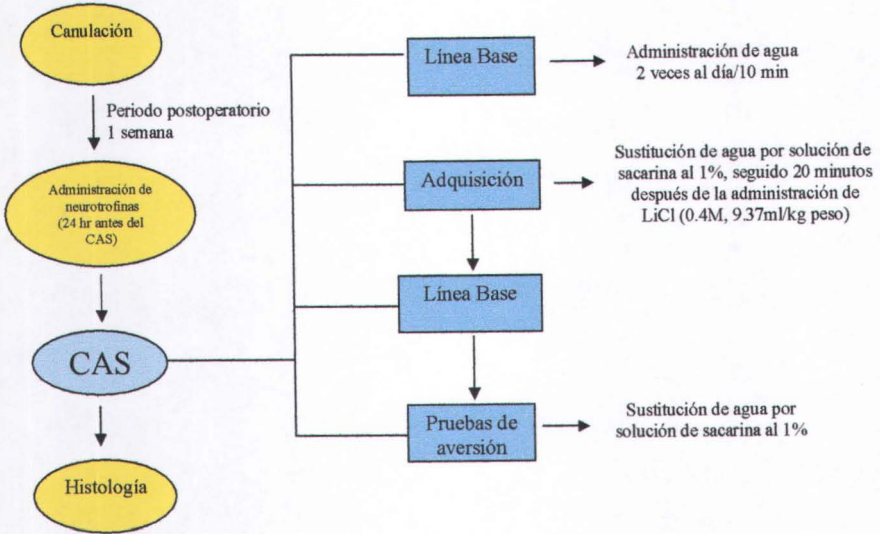
Figura 13. Diagrama de flujo del procedimiento experimental de la Fase II.

## V. RESULTADOS

### 5.1.1. Fase I: Participación del BDNF en la generación de la LTP neocortical

Tras de la microinfusión de BDNF los valores de los PPSE en el grupo BDNF se elevaron gradualmente con respecto a su línea base alcanzando a una meseta hacia las 2 horas. Por su parte los grupos VEH, CYT-C, BDNF + K252a, no mostraron cambios significativos respecto a sus líneas base (Figura 14).

varias sesiones de extinción. En los experimentos conductuales se contó con grupos controles intactos aunados a los experimentales y controles descritos. (Figura 13).

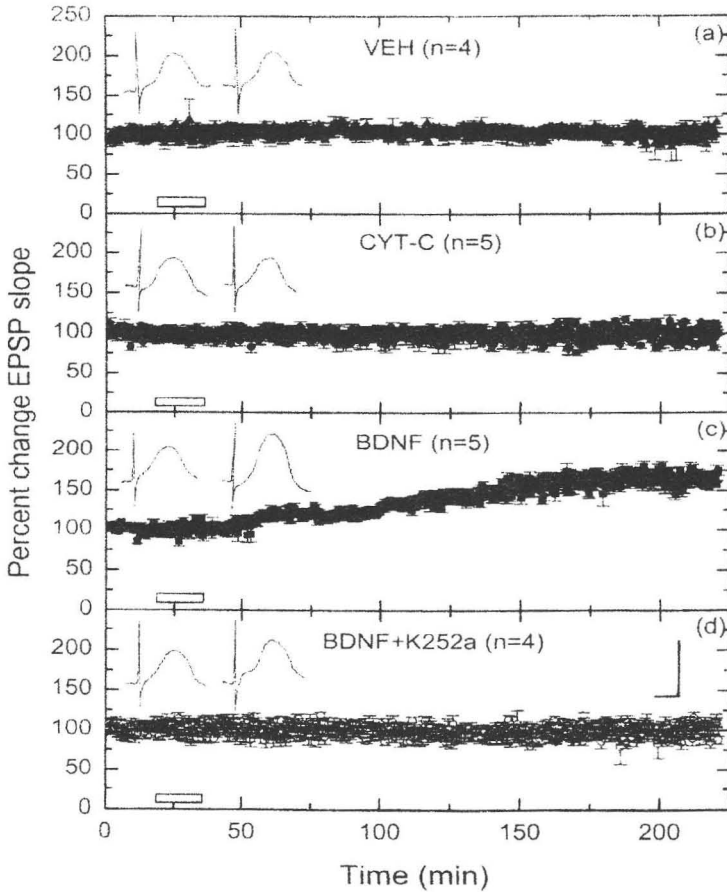


**Figura 13.** Diagrama de flujo del procedimiento experimental de la Fase II.

## V. RESULTADOS

### 5.1.1. Fase I: Participación del BDNF en la generación de la LTP neocortical

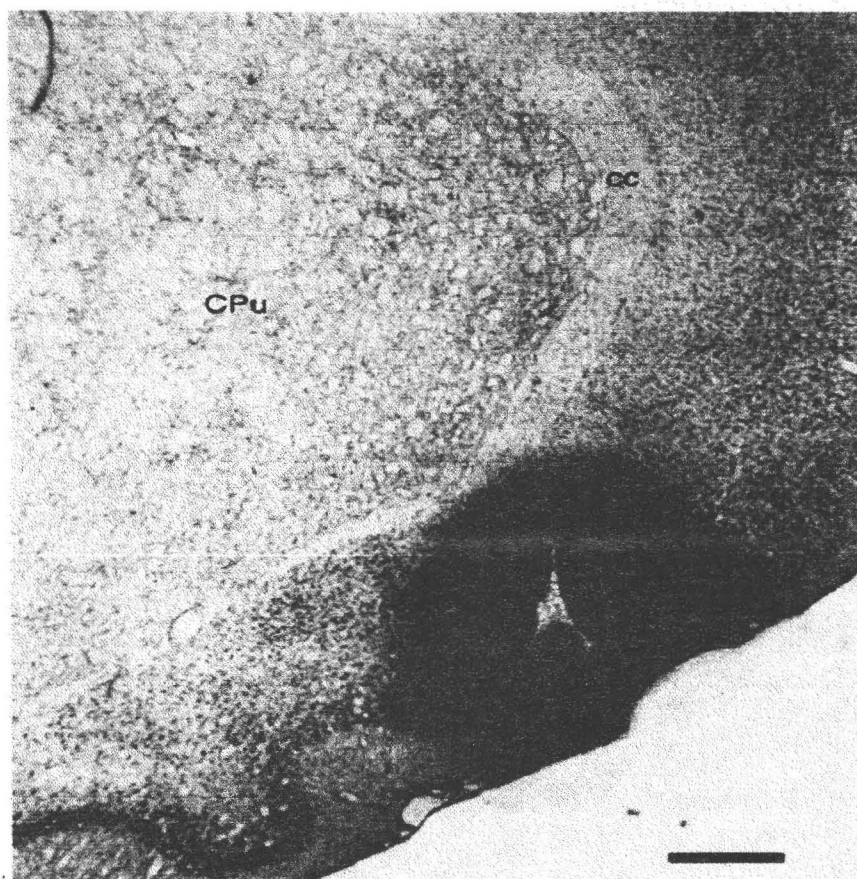
Tras de la microinfusión de BDNF los valores de los PPSE en el grupo BDNF se elevaron gradualmente con respecto a su línea base alcanzando a una meseta hacia las 2 horas. Por su parte los grupos VEH, CYT-C, BDNF + K252a, no mostraron cambios significativos respecto a sus líneas base (Figura 14).



**Figura 14.** Efectos de la microinfusión aguda de BDNF sobre las respuestas evocadas de la proyección (Bla-CI) in vivo. (a), (b), (c) y (d) gráficas de las respuestas evocadas (PPSE) en la corteza insular provenientes de animales que recibieron PBS como vehículo, Citocromo C, BDNF y BDNF + K252a, respectivamente. Tras la infusión de BDNF los valores de la pendiente de los PPSE se elevaron significativamente por encima del registro basal con un curso que inicia 15 minutos después de la administración e incrementa gradualmente hasta alcanzar una meseta estable hacia las dos horas post-infusión. A la izquierda se muestran trazos significativos de PPSE de la CI inmediatamente antes y 170 minutos después de la infusión. Las barras indican el periodo de infusión. Escala: 9ms, 0.5mV.

Los PPSE de la CI tras de la infusión de BDNF mostraron una amplitud promedio de  $0.44 \pm 0.003$  mV y una pendiente de  $0.126 \pm 0.002$  (media  $\pm$  S.E.M.). El ANOVA de la pendiente de los PPSE reveló una diferencia altamente significativa entre los grupos,  $F = 296.23$ ;  $p < 0.0001$ . Los resultados de la prueba post-hoc de Fisher mostraron una diferencia significativa del grupo BDNF con respecto al resto de los grupos ( $p < 0.0001$ ). Por su parte, los grupos VEH, CYT-C y BDNF + K252a no mostraron diferencias significativas entre sí. Hacia las 2 horas post-infusión, tiempo en el cual se alcanzan valores asintóticos de crecimiento, los cambios porcentuales de la pendiente de los PPSE fueron respectivamente para cada uno de los grupos de:  $163.73 \pm 0.48$  (BDNF);  $101.42 \pm 0.37$  (VEH);  $99.36 \pm 0.56$  (CYT-C);  $102.35 \pm 1.36$  (BDNF + K252a) (media  $\pm$  S.E.M.).

Con el fin de observar el grado de difusión de la microinfusión de BDNF en la corteza insular, se empleó la inmunohistoquímica contra BDNF. El análisis inmunohistoquímico revela una fuerte inmunoreactividad en torno al sitio de microinfusión de la neurotrofina (Figura 15).

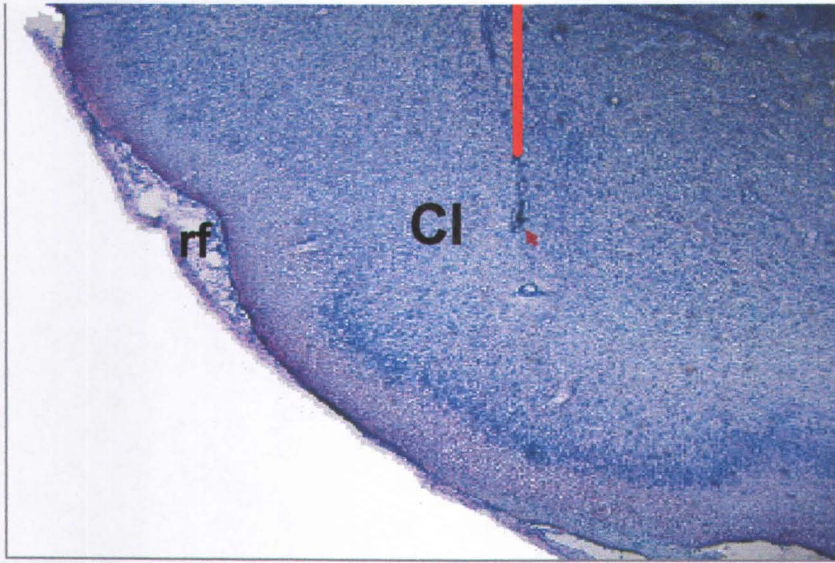


**Figura 15.** Corte coronal de la corteza insular de rata procesado con anti-BDNF, mostrando la distribución del BDNF en torno al sitio de microinfusión ( $3\mu\text{g}/3\mu\text{l}$ , 15 min). CPu: caudado putamen, cc: cuerpo calloso. Escala 1mm.



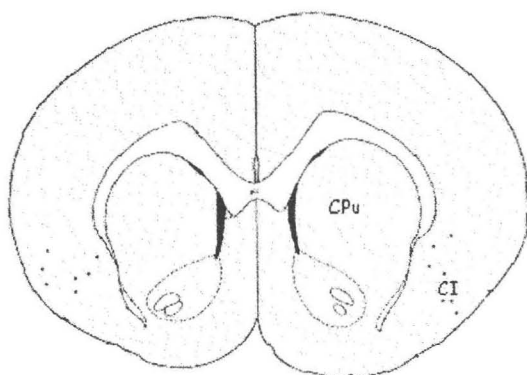
### 5.1.2. Fase II: Participación del BDNF en el CAS

Durante la etapa conductual se deslindaron los efectos del BDNF sobre la retención de esta tarea, efectuando para ello nueve sesiones de extinción. En los experimentos conductuales se contó con grupos controles intactos (CON) aunados a los grupos descritos en la fase anterior. Para demostrar la correcta posición de la punta del microinyector los cerebros procedentes de los distintos grupos, fueron procesados de acuerdo a la técnica de Nissl y analizados al microscopio de luz (Nikon, Japón) revelando su correcta posición (Figura 16).



**Figura 16:** Corte coronal que demuestra la correcta posición de la punta del microinyector. CI = corteza insular; rf = fisura rhinal.

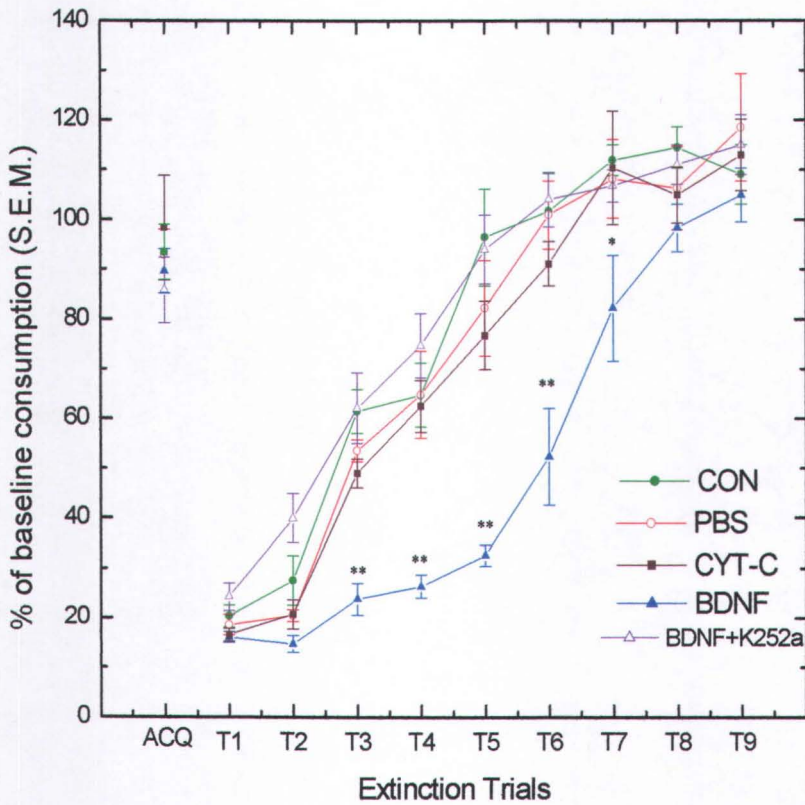
Cabe mencionar que los animales canulados que no presentaron una posición adecuada fueron excluidos del análisis experimental (Figura 17).



**Figura 17.** Representación esquemática 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.

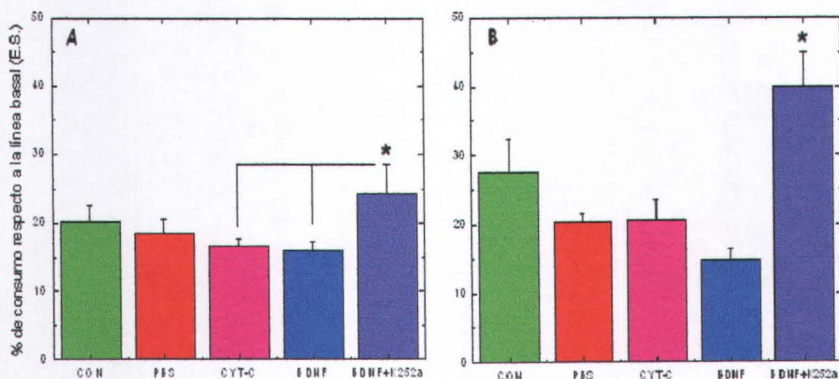
No existieron diferencias significativas entre los cinco grupos (CON (n = 7); PBS (n = 7); CYT-C (n = 6); BDNF+K252a (n = 7); BDNF (n = 9)) durante el consumo basal de agua (línea base), ni durante el consumo de la solución de sacarina durante la sesión de adquisición del condicionamiento aversivo a los sabores. Por el contrario, se observaron diferencias significativas entre los grupos durante la retención de la prueba, como se aprecia en la Figura 18 durante las sesiones de extinción. El ANOVA de medidas repetidas reveló diferencias significativas entre los grupos  $F_{(4,31)} = 31.55$ ,  $p < 0.0001$ . El análisis post-hoc empleando la prueba de Fisher mostró que el grupo BDNF presentó un incremento significativo en la retención de la tarea, como lo refleja el decremento en el consumo de sacarina, cuando se compara con los grupos restantes durante la tercera, cuarta, quinta, sexta ( $p < 0.0001$ ) y séptima sesiones de extinción ( $p < 0.05$ ) (Figura 18).

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



**Figura 18.** Participación del BDNF en la retención del CAS 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 base durante la sesión de adquisición (ADQ) y las sesiones de extinción (T1-T9) de los grupos CON (control), PBS (vehículo), CYT-C (Citocromo-C), BDNF (BDNF) y BDNF + K252a (BDNF+K252a). Se señalan diferencias significativas durante la tercera, cuarta, quinta, sexta y séptima sesión entre el grupo BDNF y los grupos restantes (\*\* $p < 0.0001$ , \* $p < 0.05$ ).

El ANOVA factorial para cada una de las sesiones de extinción revela que durante la primera sesión de extinción puede apreciarse que el grupo BDNF + K252a presenta diferencias significativas ( $*p<0.05$ ) con respecto a los grupos CYT-C y BDNF, en tanto que durante la segunda sesión de extinción se observa que existen diferencias significativas ( $*p<0.001$ ) entre el grupo BDNF + K252a con respecto a los demás grupos (Figura 19). 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 endógeno del sistema.



**Figura 19.** Efectos de la infusión de BDNF previa al entrenamiento del CAS durante la primera (A) y segunda sesiones (B) de extinción. Se observan diferencias significativas, en la primera sesión entre el grupo BDNF + K252a, con respecto a los grupos CYT-C y BDNF, ( $*p<0.05$ ). Se observan diferencias significativas en la segunda sesión de extinción entre el grupo BDNF + K252a con respecto a los demás grupos, ( $*p<0.001$ ).

## VI. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

### Psicología, Freud y Neurociencias

Desde hace varios años la psicología cognitiva y la neurobiología se han preocupado por trabajar de manera interdisciplinaria para entender mejor la complejidad de los mecanismos moleculares que subyacen a los procesos mentales. Conceptos como el de plasticidad sináptica y la LTP fueron descritos bajo la luz de la psicología por Sigmund Freud en 1895.

Sigmund Freud es considerado una de las figuras más significativas del siglo 20 debido a su teoría psicoanalítica. Sin embargo su trabajo no se basó exclusivamente en el psicoanálisis, dedicó parte de su conocimiento a la neurociencia cognitiva. En un manuscrito (no concluido) escrito en 1895 titulado: "Project for a Scientific Psychology", Freud desarrolló su teoría acerca de la posibilidad de la representación a nivel sináptico de la memoria, describiendo entre ellos varios aspectos de la LTP. Este trabajo escrito medio siglo antes que el de Donald Hebb (1949), expone varios conceptos que posteriormente Hebb definió. El propósito principal de éste trabajo era proveer bases neurobiológicas a las funciones psicológicas.

En el primer capítulo titulado "Dynamic polarization", Freud afirma que la comunicación neuronal obedece a una organización de redes neuronales y sostiene que las neuronas no están conectadas al azar, sino, de manera precisa, coincidiendo con la idea de Cajal. En un subsiguiente capítulo, Freud propone su teoría acerca de que la memoria se encuentra representada en el cerebro como "una alteración permanente originada por un evento", casi un siglo después esta idea fue confirmada por Bliss y Lomo (1973).

Una de las hipótesis descritas por Freud en su manuscrito contempla la idea de que la memoria tiene sus propios sustratos neuronales y la posibilidad de inducir de manera selectiva y permanente la facilitación sináptica de estas redes de neuronas. Los cambios en la fortaleza y la eficiencia de la transmisión sináptica (expresados en la hipótesis de Freud) se han descrito en años recientes tanto en áreas corticales como subcorticales del cerebro (Centonze et al., 2004).

## BDNF en el aprendizaje y la memoria

Se sabe que el BDNF juega un papel importante en el desarrollo cortical dependiente de actividad así como en la regulación de la excitabilidad cortical (Akaneya et al., 1997; Carmignoto et al., 1997; Rutherford et al., 1998; McAllister et al., 1999; Jiang et al., 2001). Los resultados de este estudio muestran que la microinfusión intracortical de BDNF potencia la transmisión sináptica de la proyección amígdalo-cortical (Bla-CI) en ratas adultas anestesiadas. Esto constituye una demostración in vivo de potenciación de la transmisión sináptica inducida por neurotrofinas en la corteza insular, una región neocortical implicada en la adquisición y el almacenamiento de tareas de aprendizaje aversivo (Bermúdez-Rattoni & McGaugh, 1991; Bermúdez-Rattoni et al., 1995; Escobar et al., 1998<sup>a</sup>, 1998<sup>b</sup>; Escobar & Bermúdez-Rattoni, 2000). Estos resultados concuerdan con aquellos estudios en los cuales la aplicación de BDNF produjo una potenciación en la transmisión sináptica excitatoria en la corteza visual tanto in vivo como in vitro (Akaneya et al., 1997; Carmignoto et al., 1997; Jiang et al., 2001). En estos estudios altas concentraciones de BDNF produjeron una aguda potenciación de la transmisión excitatoria basal (Carmignoto et al., 1997), en tanto que bajas concentraciones de la neurotrofina facilitaron la inducción de LTP producida por estimulación tetánica (Akaneya et al., 1997). La potenciación en nuestro estudio fue debida a la infusión de BDNF en dosis similares a aquellas utilizadas por Messaoudi et al., 1998 y por Ying et al., 2002 en el hipocampo.

Resulta interesante mencionar que los estudios en la corteza visual in vivo indican que el BDNF incrementa la transmisión sináptica excitatoria en ratas jóvenes, pero no en adultas (Jiang et al., 2001). En el presente estudio se encontró que la infusión intracortical de BDNF en la corteza insular potencia la transmisión de la proyección Bla-CI en ratas adultas. Esta discrepancia puede deberse en parte a la distribución diferencial de las variantes del receptor TrkB en la neocorteza (Jiang et al., 2001). De hecho la aplicación exógena de BDNF presenta una variedad de efectos que dependen del estadio de desarrollo de la preparación, así como del periodo de aplicación (crónica o aguda).

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). Los resultados de este

estudio mostraron que el BDNF no potenció la transmisión sináptica cuando fue aplicado en combinación con K252a. Esto sugiere que la potenciación de largo plazo en la corteza insular debida a la presencia de BDNF es mediada por la activación de receptores Trk.

### Mecanismos moleculares desencadenados por el BDNF

Los estudios que se han realizado acerca de los mecanismos moleculares que se desencadenan tras la interacción del BDNF con su receptor (Finkbeiner et al., 1997; Patapoutian & 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-fosfato cinasa (PIK3). Posteriormente, estas proteínas activan cadenas de eventos moleculares que culminan con la translocación al núcleo (Gunn-More & Távare, 1998; Patapoutian & Reichardt, 2001), una vez en el interior, transfieren grupos fosfato para la activación de CREB, quien a su vez interactúa con CRE (cAMP responsive element). Entre las proteínas que se activan durante esta cascada de señalización se encuentran la sinaptobrevina y la sinaptofisina (Yamada et al., 2002) las cuales intervienen en la modulación del número de vesículas que se anclan a la terminal presináptica, induciendo así la liberación de más neurotransmisor (Li et al., 1998).

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 incrementar la transmisión sináptica in vivo, así como el aprendizaje dependiente del hipocampo y la neocorteza (Messouadi 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. Se ha reportado así mismo que el incremento de la expresión de ARNm para BDNF tiene lugar en conjunto con el incremento de sinapsina y del receptor TrkB, lo cual sustenta modificaciones tanto pre como post-sinápticas (Gómez-Padilla & Kesslak, 2001). 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.

## BDNF y CAS

Se ha visto 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; Kesslak et al., 2003). En el presente estudio se observó que la infusión aguda de BDNF en la corteza insular aumenta la retención de la tarea del CAS. Estos resultados sugieren la participación del BDNF en los mecanismos que subyacen al almacenamiento de información llevado a cabo por la corteza insular. En concordancia con lo anterior, Kesslak et al., (2003) demostraron que la disminución de ARNm para BDNF afecta la adquisición de tareas de aprendizaje espacial (Kesslak et al., 1998; Ma et al., 1998; Mizuno et al., 2000).

En el presente estudio se observó que la presencia de esta neurotrofina es requerida para prolongar la retención del CAS en concordancia con aquellos estudios en los que el BDNF endógeno es requerido para la formación de la memoria de corto y largo plazo en tareas aversivas (Johnston & Rose, 2001; Alonso et al., 2002). De manera similar 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 inhibiendo al BDNF o a su receptor 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 (Figura 19), lo que sugiere la influencia del bloqueador de los receptores Trk aún sobre las acciones de la neurotrofina endógena del sistema. Lo anterior subraya el que en los mecanismos que subyacen a la retención de la 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 hipocámpales, 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).



## BDNF, CAS, CI, LTP

El presente estudio mostró 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. El análisis estadístico muestra que el grupo infundido con BDNF no presentó diferencias significativas en la adquisición de la tarea, sin embargo, exhibe un periodo de extinción más prolongado, lo que subraya la participación de esta neurotrofina 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 & McGaugh, 1991; Escobar et al., 1998; Escobar & Bermúdez-Rattoni, 2000). El decremento en la curva de retención del CAS debido a la infusión de K252a enfatiza la participación de los receptores de alta afinidad.

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 concuerda con 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 sólo de la plasticidad sináptica sino también de la interacción entre un organismo y su medio ambiente (Tyler et al., 2002). Estos resultados muestran que los efectos de la administración intracortical de BDNF in vivo en la corteza insular sobre la retención del CAS, son similares a los producidos tras la inducción de la LTP en la vía Bla-CI debido a la infusión de BDNF.

Rosenblum, Meiri & Dudai (1993) mostraron que la microinfusión de anisomicina (inhibidor de la síntesis protéica) en la corteza insular previo al entrenamiento del CAS

bloquea la adquisición de esta tarea. En concordancia con lo anterior, en estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio se administró anisomicina antes de la microinfusión de BDNF buscando bloquear las acciones de esta neurotrofina, de manera similar a los trabajos reportados previamente. Nuestros resultados preliminares muestran un decremento en la curva de retención del CAS en el grupo al cual se le administró anisomicina. Estos resultados preliminares subrayan la participación de la síntesis protéica como parte de los mecanismos involucrados en las acciones del BDNF sobre la plasticidad sináptica neocortical.

En conclusión, el presente estudio demuestra que la microinfusión de BDNF en ratas adultas in vivo induce potenciación de largo plazo de la eficiencia sináptica en la corteza insular, así como incremento en la retención del CAS. Estos resultados apoyan el concepto de que el BDNF juega un papel importante como mediador sináptico de la plasticidad sináptica dependiente de actividad en la neocorteza adulta in vivo.

## VII. REFERENCIAS

1. Abel T. & Lattal KM. (2001). "Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval". **Curr Opin Neurobiol.**, 11(2):180-187.
2. Abel, T., Nguyen, PV., Barad, M., Deuel, TA., Kandel, ER. & 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 (5): 615-626.
3. Aicardi G, Argilli E, Cappello S, Santi S, Riccio M, Thoenen H, Canossa M. (2004). "Induction of long-term potentiation and depression is reflected by corresponding changes in secretion of endogenous brain-derived neurotrophic factor". **Proc Natl Acad Sci U S A**, 101(44): 15788-15792.
4. Akaneya, Y., Tsumoto, T., Hatanaka, H. (1997). "Brain derived neurotrophic factor enhances long-term potentiation in rat visual cortex". **Journal of Neuroscience**, 17: 6707-6716.
5. Alonso, M., Vianna, R.M., Depino, M., Mello e Souza, T., Pereira, P., Szapiro, G., Viola, H., Pitossi, F., Izquierdo, I., Medina, J. (2002). "BDNF-triggered events in the rat hippocampus are required for both short and long-term memory formation". **Hippocampus**, 12: 551-560.
6. Altar CA, Cai N, Bliven T, Juhasz M, Conner JM, Acheson AL, Lindsay RM, Wiegand SJ. (1997). "Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain". **Nature**, 389: 856-860.
7. Aoki, C., Wu, K., Elste, A., Len, G., Lin, S., McAuliffe, G. & 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.
8. Artola, A. & 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.
9. Ascher, P. & Nowark, L. (1988). "The role of divalent cations in the N-methyl-D-aspartate responses of mouse central neurons in culture". **Journal of Physiology**, 399: 247-266.

10. Bahar A, Dudai Y, Ahissar E. (2004). "Neural signature of taste familiarity in the gustatory cortex of the freely behaving rat". **J Neurophysiol.**, 92: 3298-308.
11. Bailey, C.H., Giustteton, M., Huang, Y., Hawkins, R.D. & Kandel, E.R. (2000). "Is heterosynaptic modulation essential for stabilizing hebbian plasticity and memory?". **Nature Review of Neuroscience**, 1: 11-20.
12. Baker RE, Dijkhuizen PA, Van Pelt J, Verhaagen J. (1998). "Growth of pyramidal, but not non-pyramidal, dendrites in long-term organotypic explants of neonatal rat neocortex chronically exposed to neurotrophin-3". **European Journal of Neuroscience**, 10 (3): 1037-1044.
13. Barbacid, M. (1994). "The Trk family of neurotrophic receptors". **Journal of Neurobiology**, 10: 1037-1044.
14. Barman SM, Gebber GL, Orer HS. (2000). "Medullary lateral tegmental field: an important source of basal sympathetic nerve discharge in the cat". **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, 278(4): 995- 1004.
15. Barria, A., Derkach, V. & Soderling, T. (1997). "Identification of the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase liposporolation site in the alpha-amino-3-hydroxil-5-methyl-4-isoxazole-propionate-type glutamate receptor". **Journal of Biological Chemistry**, 272 (52): 32727-30.
16. Bartheld CS & Butowt, R. (2000). "Expression of neurotrophin-3 (NT-3) and anterograde axonal transport of endogenous NT-3 by retinal ganglion cells in chick embryos". **Journal of Neuroscience**, 20: 736-748.
17. Bartheld CS, Byers MR, Williams R, Bothwell M. (1996). "Anterograde transport of neurotrophins and axodendritic transfer in the developing visual system". **Nature**, 379: 830-833.
18. Bartheld CS, Kinoshita Y, Prevetie D, Yin QW, Oppenheim RW, Bothwell M. (1994). "Positive and negative effects of neurotrophins on the isthmo-optic nucleus in chick embryos". **Neuron**, 12: 639-654.
19. Bear & Kirkwood (1993). "Neocortical long-term potentiation". **Curr. Opin. Neurobiology**, 3: 197-202.

20. Berman DE (2003). "Modulation of taste-induced Elk-1 activation by identified neurotransmitter systems in the insular cortex of the behaving rat". **Neurobiol Learn Mem**, 79(1):122-126.
21. Berman DE & Dudai, Y. (2001). "Memory extinction, learning anew, and learning the new: dissociations in the molecular machinery of learning in cortex". **Science**, 291 (5512): 2417-2419.
22. Berman DE, Hazvi S, Neduva V, Dudai Y. (2000). "The role of identified neurotransmitter systems in the response of insular cortex to unfamiliar taste: activation of ERK1-2 and formation of a memory trace". **Journal of Neuroscience**, 20 (18): 7017-7023.
23. Berman DE, Hazvi S, Rosenblum K, Seger R, Dudai Y. (1998). "Specific and differential activation of mitogen-activated protein kinase cascades by unfamiliar taste in the insular cortex of the behaving rat". **Journal of Neuroscience**, 18 (23): 10037-10044.
24. Bermúdez-Rattoni F, Ramirez-Lugo L, Gutierrez R, Miranda MI. (2004). "Molecular signals into the insular cortex and amygdala during aversive gustatory memory formation". **Cell Mol Neurobiol.**, 24(1): 25-36.
25. Bermúdez-Rattoni, F. & Yamamoto, T. (1998). "Neuroanatomy of CTA: lesions studies". En: Bures, J., Bermúdez-Rattoni, F. & Yamamoto, T. (1998).
26. Bermúdez-Rattoni, F., Introini-Collison, I.B., Coleman-Meschers, K. & McGaugh, J.L. (1997). "Insular Cortex and Amygdala lesions induced after aversive training impair retention: effects of degree of training". **Neurobiology Learning and Memory**, 67: 57-63.
27. Bermúdez-Rattoni, F., Ormsby, C.E., Escobar, M.L. & Hernández-Echeagaray (1995). "The role of insular cortex in the acquisition and long lasting memory for aversively motivated behaviors". En: J.L. McGaugh, Bermúdez-Rattoni, F & Prado-Alcalá, R.A. (Eds), **Plasticity in the central Nervous System: Learning and Memory**, Lawrence Erlbaum Associates, Hillside, N.J. 67-82.
28. Bermúdez-Rattoni, F. & McGaugh J.L. (1991). "Insular cortex and amygdala lesions differentially affect acquisition of inhibitory avoidance and conditioned taste aversion". **Brain Research**, 549: 165-170.

29. Bernstein, I. (1991). "Flavor Aversion" en TV Getchell, R.L. Doty, L.M. Bartoshuk & J.B., Snow, Jr. (Eds.) **Smell and Taste in Health and Disease**. Raven Press: USA.
30. Bliss, T.V. & Collingridge, G.L. (1993). "A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus". **Nature**, 361: 31-39.
31. Bliss, T.V. & Lomo, T.V.P. (1973). "Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anesthetized rabbit following stimulation of the perforant path". **Journal of Physiology**, 232: 331-356
32. Boulton, A.A., Baker, G.B. & Hefti, F. (1993). *Neurotrophic Factors*. (Vol. 25): Human Press. USA.
33. Bounomano, D.V. & Merzenich, M.M. (1998). "Cortical plasticity". **Annual Review of Neuroscience**. 21: 149-186.
34. Bothwell, M. (1991). " Keeping track of Neurotrophin Receptor" **Cell**, 65: 915-918.
35. Bozzi, Y., Pizzarusso, T., Cremisi, F., Rossi, F.M., Barsacchi, G., et al. (1995). "Monocular deprivation decreases the expression of messenger RNA for brain-derived neurotrophic factor in the rat visual cortex". **Neuroscience**, 69: 1133-1144.
36. Bradley J. & Sporns O. (1999). "BDNF-dependent enhancement of exocytosis in cultured cortical neurons requires translation but not transcription". **Brain Research**, 815: 140-149.
37. Bramham, CR., Southard, T., Sarvey, JM., Herkenham, M. & Brady, LS. (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 (3): 371-382.
38. Braun, J.J., P.S. Lasiter & S.W. Kiefer (1982). "The gustatory neocortex of the rat". **Physiol. Psychol**, 10: 13-45.
39. Brown, J.J., Lasiter, P.S. & Kiefer, S.W. (1982). "The gustatory neocortex of the rat". **Physiol. Psychol**, 10: 13-45.
40. Bures, J. (1998). "Ethology, physiological psychology, and neurobiology of CTA" en Bures, J., Bermúdez-Rattoni, F. & Yamamoto, T. (1998). **Conditioned Taste Aversion**. Oxford Science Publication, USA.

41. Carmignoto, G., Pizzorusso, T., Tia, S. & Vicini, S. (1997). "Brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor potentiate excitatory synaptic transmission in the rat visual cortex". **Journal of Physiology**, 498: 153-164.
42. Centonze D, Siracusano A, Calabresi P, Bernardi G. (2004). "The Project for a Scientific Psychology (1895): a Freudian anticipation of LTP-memory connection theory". **Brain Res Brain Res Rev.**, 46(3): 310-314.
43. Chao, M.V. (1992). " Neurotrophin Receptor: a Window into Neuronal Differentiation". **Neuron**, 9: 583-593.
44. Chen, W.R., Lee, S., Sato, K., Spencer, D.D., Sheperd, G.M. & Williamson, A. (1999). "Long-term modifications of synaptic efficacy in the human inferior and middle temporal cortex". **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 93: 8011-8025.
45. Cheng Liang, K., Hon, W. & Davis, M. (1994). "Pre- and post training infusion of N-methyl-D-aspartate receptor antagonist into the amygdala impair memory in an inhibitory avoidance task". **Behavioral Neuroscience**, 2: 241-253.
46. Clugnet MC, LeDoux JE, Morrison SF. (1990). " Unit responses evoked in the amygdala and striatum by electrical stimulation of the medial geniculate body". **Journal of Neuroscience**, 10: 1055-1061.
47. Collin, C., Vicario-Abejon, C., Rubio, M.E., Wenthold, R.J., McKay, R.D.G. & Segal, M. (2001). "Neurotrophins act at presynaptic terminals to activate synapses among cultured hippocampal neurons. **European Journal of Neuroscience**, 13: 1273-1282.
48. Collingridge, GL., Kehl, SJ., McLennan, H. (1983). "Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus". **Journal of Physiology**, 334: 33-46.
49. Crunelly, V. & Mayer, ML (1984). "Mg<sup>2+</sup> dependence of membrane resistance increases evoked by NMDA in hippocampal neurons". **Brain Research**, 311(2): 392-396.
50. Dash, PK., Hochner, B. & Kandel, ER. (1990). "Injection of the cAMP-responsive element into the nucleus of Aplysia sensory neurons blocks long-term facilitation". **Nature**, 345 (6277): 718-721.

51. Davis, S., Butcher, SP. & Morris, R. (1992). "The NMDA receptor antagonist 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.
52. Davis, HP. & Squire, LR (1984). "Protein synthesis and memory: a review". **Psychology Bulletin**, 96 (3): 518-559.
53. Dechant, G., Rodríguez-Tebar, A. & Barde, Y.A. (1994). "Neurotrophin receptors". **Prog. Neurobiol**, 42: 347-352.
54. Dudai, Y. (2004). "The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram?". **Annual Review Psychology**, 55: 51-86.
55. Dunn, L. & Everitt, B. (1988). "Double dissociations of the effects of amygdale and insular cortex lesions on conditioned taste aversion, passive avoidance, and neophobia in the rat using the excitotoxin ibotenic acid". **Behavioral Neuroscience**, 102 (1): 3-23.
56. Edwards, FA. (1995). "LTP- a structural model to explain the inconsistencies". **TINS**, 18 (6): 250-255.
57. Eichenbaum (1997). "To cortex: thanks for the memories". **Neuron**, 19: 481- 484.
58. Escobar, M.L., Alcocer, I., Bermúdez-Rattoni, F. (2002). "In vivo effects of intracortical administration of NMDA and metabotropic glutamate receptors antagonist on neocortical long-term potentiation and conditioned taste aversion". **Brain Research**, 129: 101-106.
59. Escobar, M.L. & Bermúdez-Rattoni, F. (2000). "Long-term potentiation in the insular cortex enhances conditioned taste aversion retention". **Brain Research**, 852: 208-212.
60. Escobar, M.L., Chao, V. & Bermúdez-Rattoni, F. (1998a). "In vivo long-term potentiation in the insular cortex: NMDA receptor dependence". **Brain Research**, 779: 314-319.
61. Escobar, M.L., Alcocer, I. & 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.
62. Escobar, M.L. (1994). "El factor de Crecimiento Neuronal en el Sistema Nervioso Central" **Science**, 45: 21-34.



63. Escobar, M.L., J. Fernández, R. Guevara-Aguilar & 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.
64. Falls, W.A., Miserendino, M.J. & Davis, M. (1992). "Extinction of fear-potentiated startle: blockade by infusion of an NMDA antagonist into the amygdala." **Journal of Neuroscience**, 12 (3): 854-863.
65. Farhadi HF, Mowla SJ, Petrecca K, Morris SJ, Seidah NG, Murphy RA. (2000). "Neurotrophin-3 sorts to the constitutive secretory pathway of hippocampal neurons and is diverted to the regulated secretory pathway by coexpression with brain-derived neurotrophic factor". **Journal of Neuroscience**, 20: 4059-4068.
66. Fazeli, MS., Errington, ML., Dolphin, AC & Bliss, TV. (1990). "Increased efflux of a hemoglobin-like protein and an 80 kDa protease into push-pull perfusates following the induction of long-term potentiation in the dentate gyrus". **Brain Research**, 521 (1-2): 247-253.
67. Figurov, A., Pozzo-Miller, L.D., Olafsson, P., Wang, T., Lu, B. (1996). "Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus." **Nature**, 381: 706-709.
68. Finkbeiner, S., Tavazoie, S.F., Maloratsky, A., Jacobs, M.J., Harris, K.M. & Greenberg, M.E. (1997). "CREB: a major mediator of neuronal neurotrophic responses". **Neuron**, 19: 1031-1047.
69. Garcia, J. & Koelling, Y. (1966). "Relation of cue to consequence in avoiding learning". **Psychonomic Science**, 4: 123-124.
70. Ghosh, A., Carnahan, J. & Greenberg, M.E. (1994). "Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons." **Science**, 263: 1618-1623.
71. Goinez-Pinilla F, So V, Kesslak JP. (2001). "Spatial learning induces neurotrophin receptor and synapsin I in the hippocampus". **Brain Research**, 904: 13-19.
72. Gottschalk W, Pozzo-Miller LD, Figurov A, Lu B. (1998). "Presynaptic modulation of synaptic transmission and plasticity by brain-derived neurotrophic factor in the developing hippocampus". **Journal of Neuroscience**, 18: 6830-6839.

73. Gotz R, Koster R, Winkler C, Raulf F, Lottspeich F, Scharl M, Thoenen H. (1994). "Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family". **Nature**, 372: 266-269.
74. Gunn-Moore, F. & Tavaré, M. (1998). "Understanding the molecular mechanism of neurotrophic factor signalling". **Cell**, 10: 151-157.
75. Gutiérrez, H., Hernández-Echegaray, E., Ramírez-Amaya, V & Bermudez-Rattoni, F. (1999). "Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors in the insular cortex disrupts taste aversion and spatial memory formation". **Neuroscience**, 89 (3): 751-758.
76. Hagiwara, M., Brindle, P., Harootunian, A., Armstrong, R., Rivier, J. & 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.
77. Hall, ZW (1992). **Introduction to molecular neurobiology**. Massachusetts: Sinauer Associates, INC.
78. Harris, EW., Ganong, AH. & Cotman, CW. (1984). "Long-term potentiation in the hippocampus involves activation of N-methyl-D-aspartate receptors". **Brain Research**, 323 (1): 132-137.
79. Hebb, D.O. (1949). **The organization of behavior**. Wiley, USA.
80. Hirsch, J.C. & Crepel, F. (1990). "Use-dependent changes in synaptic efficacy in rat prefrontal neurons in vitro" **Journal of Physiology**, 427: 31-49.
81. Huang, YY., Li, XC. & Kandel, ER. (1994). "cAMP contributes to mossy fiber LTP by initiating both a covalently mediated early phase and macromolecular synthesis-dependent late phase". **Cell**, 79 (1): 69-79.
82. Ip, N.Y. & Yancopoulos, G.D. (1996). "The neurotrophins and CNTF: two families of collaborative neurotrophic factors". **Annu. Rev. Neurosci**, 19: 491-515.
83. 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. & Yancopoulos, G.D. (1992). "Mammalian Neurotrophin-4: Structure, Chromosomal Localization, Tissue Distribution, and Receptor Specificity". **Proc Natl Acad Sci**, 89: 3060-3064.

84. Izquierdo, I. & Medina, J.H. (1995). "Correlation between the pharmacology of Long-Term Potentiation and the pharmacology of memory". **Neurobiol-Learn-Mem**, 63 (1): 19-32.
85. Jahr, CE. & Stevens, CF. (1987). "Glutamate activates multiple single channel conductances in hippocampal neurons". **Nature**, 325 (6104): 522-525.
86. Jankowsky, J.L. & Patterson, P.H. (1999). "Cytokine and growth factor involvement in long-term potentiation". **Molecular and cellular neuroscience**, 14: 237-286.
87. Jiang, B., Akaneva, Y., Ohshima, M., Ichisaka, S., Hata, Y., Tsunoto, 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.
88. Jones, M.W., French, P.J., Bliss, T.V. & Rosenblum, K. (1999). "Molecular mechanism of long-term potentiation in the insular cortex in vivo". **Journal of Neuroscience**. 19 (21): 1-8.
89. Johnson F, Hohmann SE, DiStefano PS, Bottjer SW (1997). "Neurotrophins suppress apoptosis induced by deafferentation of an avian motor-cortical region" **Journal of Neuroscience**, 17: 2101-2111.
90. Johnston, ANB. & 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.
91. Kafitz KW, Rose CR, Thoenen H, Konnerth A. (1999). "Neurotrophin-evoked rapid excitation through TrkB receptors". **Nature**, 401: 918-921.
92. Kang, H. & Schuman, E.M. (1995). "Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus". **Science**, 267: 1658-1662.
93. Keller, A., Pavlides, C. & Asanuma, H. (1990). "Long-term potentiation in the cat somatosensory cortex". **NeuroReport**. 1: 49-52.
94. Kennedy, MB & Marder, EM (1992). "Cellular and molecular mechanisms of neuronal plasticity". **Introduction to molecular neurobiology** Ed by Hall ZW. Massachusetts: Sinauer Associates INC.

95. Kennedy, MB., Bennett, MK., Bulleit, RF., Erondou, NE., Jennings, VR., Miller, SG., Molloy, SS., Patton, BL & Schenker, LJ (1990). "Structure and regulation of type II calcium/calmodulin-dependent protein kinase in central nervous system neurons". **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, 55: 101-110.
96. Kesslak JP, Chuang KR, Berchtold NC. (2003). "Spatial learning is delayed and brain-derived neurotrophic factor mRNA expression inhibited by administration of MK-801 in rats". **Neuroscience Letter**, 353(2): 95-98.
97. Kesslak JP, So V, Choi J, Cotman CW, Gomez-Pinilla F. (1998). "Learning upregulates brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid: a mechanism to facilitate encoding and circuit maintenance?". **Behavioural Neuroscience**, 112(4): 1012-1019.
98. Kiefer SW. & Orr MR. (1992). "Taste avoidance, but not aversion, learning in rats lacking gustatory cortex". **Behavioural Neuroscience**, 106: 140-146.
99. Kiefer SW & Morrow NS. (1991). "Odor cue mediation of alcohol aversion learning in rats lacking gustatory neocortex". **Behavioural Neuroscience**, 105: 25-32.
100. Kiefer SW, Morrow NS, Metzler CW. (1988). "Alcohol aversion generalization in rats: specific disruption of taste and odor cues with gustatory neocortex or olfactory bulb ablations". **Behavioural Neuroscience**, 102: 733-739.
101. Kiefer, S.W. (1985). "Neural mediation of conditioned food aversions". **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, 443: 100-109.
102. Kiefer SW, Cabral RJ, Garcia J. (1984). "Neonatal ablations of the gustatory neocortex in the rat: taste aversion learning and taste reactivity". **Behavioural Neuroscience**, 98: 804-812.
103. Kiefer SW, Rusiniak KW, Garcia J. (1982). "Flavor-illness aversions: gustatory neocortex ablations disrupt taste but not taste-potentiated odor cues". **J Comp Physiol Psychol**, 96: 540-8.
104. Kogan, JH., Frankland, PW., Blendy, JA., Coblenz, J., Marowitz, Z., Schutz, G. & Silva, AJ (1997). "Spaced training induces normal long-term memory in CREB mutant mice". **Curr Biol**, 7 (1): 1-11.

105. Kohara, K., Kitamura, A., Morishima, M. & Tsumoto, T. (2001). "Activity-dependent transfer of brain-derived neurotrophic factor to postsynaptic neurons". **Science**, 291: 2419-2423.
106. Komatsu, Y., Fujii, K., Maeda, J., Sakaguchi, H. & Tomaya (1988). "Long-term potentiation of synaptic transmission in kitten visual cortex". **Journal of Neurophysiology**, 59: 124-141.
107. Komatsu, Y., Toyama, K., Maeda, J. & Sakaguchi, H. (1981). "Long-term potentiation investigated un a slice preparation of striate cortex of young kittens". **Neuroscience Letter**, 26: 269-274.
108. Korte, M., Carroll, P., Wolf, E., Brem, G., Thoenen, H., et al, (1995). "Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor". **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 93: 12547-12552.
109. Krettek, J.E. & Price J.L. (1974). "A direct input from the amygdale to the thalamus and the cerebral cortex". **Brain Research**, 67: 169-174.
110. Lai KO, Fu WY, Ip FC, Ip NY. (1998). "Cloning and expression of a novel neurotrophin, NT-7, from carp". **Mol Cell Neurosci**, 11: 64-76.
111. Lasiter P.S. (1983). "Gastrointestinal reactivity in rats lacking anterior insular neocortex". **Behav Neural Biol.**, 39(1): 149-54.
112. Lasiter, P.S., Glanzman, D.L. & Mensah, P.A. (1982). "Direct connectivity between pontine taste areas and gustatory neocortex in rat". **Brain Research**, 243: 111-121.
113. LeDoux, J.E. (1993). "Emotional memory systems in the brain". **Behavioral Brain Research**, 58: 69-79.
114. Lee, S.M., Weisskopf, M.G. & Ebner, F.F. (1991). "Horizontal long-term potentiation of responses in rat somatosensory cortex". **Brain Research**, 544: 303-310.
115. Lessmann V, Gottmann K, Malcangio M. (2003). "Neurotrophin secretion: current facts and future prospects". **Progress in Neurobiology**, 69 (5): 341-374.
116. Lessmann V & Heumann R. (1998). "Modulation of unitary glutamatergic synapses by neurotrophin-4/5 or brain-derived neurotrophic factor in hippocampal

- microcultures: presynaptic enhancement depends on pre-established paired-pulse facilitation". **Neuroscience**, 86: 399-413.
117. Levine, E.S., Dreyfus, C.F., Black, I.B. & Plummer, M.R. (1995). "Brain-derived neurotrophic factor rapidly enhances synaptic transmission in hippocampal neurons via postsynaptic tyrosine kinase receptors". **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 92: 8074-8077.
  118. Li, Y.X., Zhang, Y., Lester, H.A., Schuman, E.M. & Davidson, N. (1998). "Enhancement of neurotransmitter release induced by BDNF in cultured hippocampal neurons". **Journal of Neuroscience**, 18: 10231-10240.
  119. Liang, K. C., McGaugh, J.L. & Yao, H.Y. (1990). "Involvement of amygdala pathways in the influence of post-training intra-amygdala norepinephrine and peripheral epinephrine on memory storage". **Brain Research**, 508 (2): 225-233.
  120. Lindsay, R.M., Wiegand, S.J., Altar, C.A. & DiStefano, P.S. (1994). "Neurotrophic factors: from molecule to man". **Trends Neurosci.**, 17: 182-190.
  121. Lohof AM, Ip NY, Poo MM. (1993). "Potentiation of developing neuromuscular synapses by the neurotrophins NT-3 and BDNF". **Nature**, 363: 350-353.
  122. Lu, B. & Chou, A. (1999). "Neurotrophins and hippocampal synaptic transmission and plasticity" **Journal of Neuroscience Research**, 58: 76-87.
  123. Lynch, M.A. (2004). "Long Term Potentiation and Memory". **Physiology Review**, 84: 87-136.
  124. Lynch, G. & Granger, R. (1986). "Variations in synaptic plasticity and types of memory in corticohippocampal networks". **Journal Cogn. Neuroscience**, 4(3): 189-199.
  125. Ma, YL., Chen, KY., Wei, CL., Lee, EHY. (1998). "Corticotropin-releasing factor enhances brain-derived neurotrophic factor gene expression to facilitate memory retention in rats". **Chin. J. Physiol.**, 42: 73-81.
  126. MacDermott, AB., Mayer, ML., Westbrook, GL., Smith, SJ. & Barker, JL (1986). "NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurons". **Nature**, 321 (6069): 519-522.
  127. Malenka, RC (1994). "Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD". **Cell**, 78 (4): 535-538.

128. Malenka, RC. & Nicoll, RA. (1993). "NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms". **Trends Neuroscience**, 16 (12): 521-527.
129. Malenka, RC., Kauer, JA., Mauk, MD., Kelly, PT. et al. (1989). "An essential role for postsynaptic calmodulin and protein kinase activity in long term potentiation". **Nature**, 340 (6234): 554-557.
130. Maren, S. (1996) "Synaptic transmission and plasticity in the amygdala. An emerging physiology of fear conditioning circuits". **Molecular Neurobiology**, 13 (1): 1-22.
131. Martinez, J. & Derrick, B. (1996). "Long term potentiation and learning". **Annual Review of Psychology**, 47: 173-203.
132. Matthies, H. (1989). "In search of cellular mechanisms of memory". **Prog Neurobiology**, 32 (4): 277-349.
133. Mayford, M., Bach, ME., Huang, YY., Wang, L., Hawkins, RD. & Kandel, ER. (1996). "Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene". **Science**, 274 (5293): 1678-1683.
134. McAllister, A.K., Katz, L.C., Lo, D.C. (1999). "Neurotrophins and synaptic plasticity". **Annual Review of Neuroscience**, 22: 295-318.
135. McAllister, A.K., Katz, L.C., Lo, D.C. (1995). "Neurotrophins regulate dendritic growth in developing visual cortex". **Neuron**, 15 (4): 791-803.
136. McGaugh, J.L., Introini-Collison, I.B., Nagahara, A.H., Cahill, L., Brioni, J.D. & Castellano, C. (1990). "Involvement of the amygdaloid complex in neuromodulatory influences on memory storage". **Neuroscience Behavioral Review**, 14 (4): 425-431.
137. McKerman, MG. & Shinnick-Gallagher, P. (1997). "Fear conditioning induces a lasting potentiation of synaptic currents in vitro". **Nature**, 390 (6660): 607-611.
138. Meakin, S.O. & Shooter, E.M. (1992). "The nerve growth factor family of receptors". **Trends in Neuroscience** 15: 323-331.
139. Messaoudi, E., Ying, S.W., Kanhema, T., Croll, D.D., Bramham, C.R. (2002). "BDNF triggers transcription-dependent, late phase LTP in vivo". **Journal of Neuroscience**, 22: 7453-7461.

140. Messaoudi, E., Bardsen, K., Srebro, B., Bramham, C. (1998). "Acute intrahippocampal infusion of BDNF induces lasting potentiation of synaptic transmission in the rat dentate gyrus". **Journal of Neurophysiology**, 79: 496-499.
141. Minichiello, L., Calella, A.M., Medina, D.L., Bonhoeffer, T., Klein, R. & Korte, M. (2002). "Mechanism of Trk-mediated hippocampal long-term potentiation". **Neuron**, 24: 401-414.
142. Minichiello, L., Korte, M., Wolfer, D., Kuhn, R., Unsicker, K., Cestari, V. (1999). "Rossi-receptors in hippocampus –mediated learning". **Neuron**, 24: 401-414.
143. Miranda MI & McGaugh JL. (2004). "Enhancement of inhibitory avoidance and conditioned taste aversion memory with insular cortex infusions of 8-Br-cAMP: involvement of the basolateral amygdala". **Learning and Memory**, 11: 311-317.
144. Mizuno M, Yamada K, He J, Nakajima A, Nabeshima T. (2003). "Involvement of BDNF receptor TrkB in spatial memory formation". **Learning and Memory**, 10: 108-115.
145. Mizuno M, Yamada K, Olariu A, Nawa H, Nabeshima T. (2000). "Involvement of brain-derived neurotrophic factor in spatial memory formation and maintenance in a radial arm maze test in rats". **Journal of Neuroscience**, 20: 7116-7121.
146. Montarolo, PG., Goelet, P., Castellucci, VF., Morgan, J., Kandel, ER. & Schacher, S. (1986). "A critical period for macromolecular synthesis in long-term heterosynaptic facilitation in Aplysia". **Science**, 234 (4781): 1249-1254.
147. Morimoto, K., Sato, K., Sato, S., Yamada, N. & Hayabara, T. (1998). "Time-dependent changes in neurotrophic factor mRNA expression after kindling and long-term potentiation in rats". **Brain Research Bulletin**, 45 (6): 599-605.
148. Morris, S.H., Knevet, S., Lerner, E.G. & Bindman, L.J. (1999). "Group I mGluR agonist DHPG facilitates the induction of LTP in rat prelimbic cortex in vitro". **Journal of Neurophysiology**, Oct; 82 (4): 1927-1933.
149. Morris, RG., Anderson, E., Lynch, GS. & Baundry, M. (1986). "Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5". **Nature**, 297 (5868): 681-683.



150. Mowla SJ, Pareek S, Farhadi HF, Petrecca K, Fawcett JP, Seidah NG, Morris SJ, Sossin WS, Murphy RA. (1999). "Differential sorting of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons". **Journal of Neuroscience**, 19: 2069-2080.
151. Mu JS, Li WP, Yao ZB, Zhou XF. (1999). "Deprivation of endogenous brain-derived neurotrophic factor results in impairment of spatial learning and memory in adult rats". **Brain Research**, 835: 259-265.
152. 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.
153. Naor C. & Dudai, Y. (1996). "Transient impairment of cholinergic function in the rat insular cortex disrupts the encoding of taste in conditioned taste aversion". **Behavioral Brain Research**, 79:61-67.
154. Nayak A., Zastrow, DJ., Lickteig, R., Zahniser, NR., Browning, MD (1998). "Maintenance of late-phase LTP is accompanied by PKA-dependent increase in AMPA receptor synthesis". **Nature**, 394 (6694): 680-683.
155. Nerad, L., Ramirez-Ayala, V., Ormsby, C.E. & 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.
156. Nguyen, PV., Abel, T. & Kandel, ER. (1994). "Requirement of a critical period of transcription for induction of a late phase of LTP". **Science**, 262 (5175): 1104-1107.
157. Nicoll, R.A. & Malenka, R.C. (1995). "Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus". **Nature**, 377 (6545): 115-118.
158. Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbert, A. & Prochiantz, A. (1984). "Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurons". **Nature**, 307 (5950): 462-465.
159. Pang PT, Teng HK, Zaitsev E, Woo NT, Sakata K, Zhen S, Teng KK, Yung WH, Hempstead BL, Lu B. (2004). "Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is

- essential for long-term hippocampal plasticity". **Science**, 306: 487-491.
160. Patapoutian, A. & Reichardt, L.F. (2001). "Trk receptors: mediators of neurotrophin action". **Current Opinion of Neurobiology**, 11: 272-280.
161. Patterson, S.L., Pittinger, C., Martin, K.C., Scanlin, H., Drake, C. & 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.
162. Patterson, S.L., Abel, T., Deuel, T.A., Martin, K.C., Rose, J.C., et al. (1996). "Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice". **Neuron**, 16: 1137-1145.
163. Paul J, Gottmann K, Lessmann V. (2001). "NT-3 regulates BDNF-induced modulation of synaptic transmission in cultured hippocampal neurons". **Neuroreport**, 28: 2635-2639.
164. Paxinos, G. & Watson, C. (1995). **The rat brain in stereotaxic coordinates**. Academic Press, Orlando, FL.
165. Ramirez-Amaya, V., Álvarez-Borda, B., Ormsby, C.E., Martínez, R.D., Pérez-Montfort, R. & Bermúdez-Rattoni, F. (1996). "Insular cortex lesions impair the acquisition of conditioned immunosuppression". **Brain Behavioral Immunity**, 10: 103-114.
166. Richardson, S.J. (1973). "The amygdala: historical and functional analysis". **Acta Neurobiologiae Experimentals**, 33: 623-648.
167. Rioult-Pedotti MS, Friedman D, Donoghue JP. (2000). "Learning-induced LTP in neocortex". **Science**, 290: 533-536.
168. Rioult-Pedotti MS, Friedman D, Hess G, Donoghue JP. (1998). "Strengthening of horizontal cortical connections following skill learning". **Nature Neuroscience**, 3: 230-234.
169. Rogan, M.T., Staubli, U.V. & LeDoux, J.E. (1997). "Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala". **Nature**, 390 (6660): 604-607.
170. Rosenblum K, Berman DE, Hazvi S, Lamprecht R, Dudai Y. (1997) "NMDA receptor and the tyrosine phosphorylation of its 2B subunit in taste learning in the

- rat insular cortex". **Journal of Neuroscience**, 17 (13): 5129-5135.
171. Rosenblum K, Meiri N, Dudai Y. (1993). "Taste memory: the role of protein synthesis in gustatory cortex". **Behav Neural Biol**, 59: 49-56.
  172. Rusell, R.W., et al. (1994). **Behav. Neur. Biol.**, 61: 81-92.
  173. Rutherford, L.C., Nelson, S.B., Turrigiano, G.G. (1998). "BDNF has opposite effects on the quantal amplitude of pyramidal neuron and interneuron excitatory synapses." **Neuron**, 21: 521-530.
  174. Schafe GE & Bernstein IL. (1998). "Forebrain contribution to the induction of a brainstem correlate of conditioned taste aversion. II. Insular (gustatory) cortex". **Brain Research**, 800: 40-47.
  175. Schinder, A.F. & Poo, M.M. (2000). "The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity." **Trends of Neuroscience**, 23: 639-645.
  176. Schuman, E. (1997). "Growth factors sculpt the synapses" **Science**, 275: 1277 – 1278.
  177. Segal, R.A. & Greenberg, M.E. (1996). "Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors". **Annu. Rev. Neurosci.**, 19: 463-489.
  178. Shors, T.J. & Matzel, LD (1997). "Long-term potentiation: what's learning got to do with it?" **Behavioral Brain Science**, 20 (4): 597-614.
  179. Silva, A.J., Kogan, JH., Frankland, PW & Kida, S. (1998). "CREB and memory". **Annual Review of Neuroscience**, 21 (3): 127-148.
  180. Stoop R & Poo MM. (1996). "Synaptic modulation by neurotrophic factors: differential and synergistic effects of brain-derived neurotrophic factor and ciliary neurotrophic factor". **Journal of Neuroscience**, 16: 3256-3264.
  181. Taniguchi N, Takada N, Kimura F, Tsumoto T. (2000). "Actions of brain-derived neurotrophic factor on evoked and spontaneous EPSCs dissociate with maturation of neurones cultured from rat visual cortex". **J Physiol.**, 527: 579-92.
  182. 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
  183. Tsumoto, T. (1992). "Long-term potentiation and long-term depression in the neocortex". **Prog. Neurobiol.**, 39: 209-228.

184. Tully, T. (1991). "Physiology of mutations affecting learning and memory in *Drosophila*- the missing link between gene product and behavior". **Trends Neuroscience**, 14 (5): 163-164.
185. Tyler, W.J., Alonso, M., Bramham, C.R. & Pozzo-Miller, L.D. (2002). "From Acquisition to Consolidation: On the Role of Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling in Hippocampal-Dependent Learning". **Learning & Memory**, 9: 224-237.
186. Tyler, W.J. & Pozzo-Miller, L.D. (2001). "BDNF enhances quantal transmitter release increases the number of docked vesicles at the active zone of hippocampal excitatory synapses". **Journal of Neuroscience**, 21: 4249-4258.
187. Urban, N.N. & 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 (13): 4293- 4299.
188. Yamamoto, T., Fujimoto, Y., Shimura, T & Sakai, N. (1995). "Conditioned taste aversion in rats with excitotoxic brain lesions". **Neuroscience Research**, 22: 31- 49.
189. Yamamoto T, Shimura T, Sako N, Yasoshima Y, Sakai N. (1994). "Neural substrates for conditioned taste aversion in the rat". **Behav Brain Res**. 65: 123-37.
190. Yamamoto, T., Matsuno, R. & Kawamura, Y. (1980). "Localization of cortical gustatory area in rats and its role in taste discrimination". **Journal of Neuropsychology**, 44: 440-455.
191. Yamada K & Nabeshima T. (2003). "Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes". **J Pharmacol Sci**, 91: 267-270.
192. Yamada, K., Mizuno, M., Nabeshima, T. (2002). "Role for brain-derived neurotrophic factor in learning and memory". **Life Science**, 70: 735-744.
193. Yasoshima Y & Yamamoto T. (1998). "Short-term and long-term excitability changes of the insular cortical neurons after the acquisition of taste aversion learning in behaving rats". **Neuroscience**, 84: 1-5.
194. Yin, J.C., Wallach, J.S., Del Vecchio, M., Wilder, E.L., Zhou, H., Quinn, W.G. & Tully, T (1994). "Induction of a dominant negative CREB transgene specifically

blocks long-term memory in *Drosophila*". *Cell*, 79 (1): 49-58.

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

# APENDICE



Short communication

## In vivo insular cortex LTP induced by brain-derived neurotrophic factor

Martha L. Escobar\*, Yazmín Figueroa-Guzmán, Andrea Gómez-Palacio-Schjetnan

*División de Investigación y Estudios de Posgrado, Facultad de Psicología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cub. 4 y 5, 1<sup>er</sup> Piso, Edif. D, C.P. 04510 México D.F., México*

Accepted 13 August 2003

### Abstract

Recent studies suggest that brain-derived neurotrophic factor (BDNF) plays a critical role in long-term synaptic plasticity in the adult brain. Previous studies on the insular cortex (IC), a region of the temporal cortex implicated in the acquisition and storage of different aversive learning tasks, have demonstrated that tetanic stimulation of the basolateral nucleus of the amygdala (Bla) induces an *N*-methyl-D-aspartate (NMDA)-dependent form of long-term potentiation (LTP) in the IC of adult rats *in vivo*. Here, we show that acute intracortical microinfusion of BDNF induces a lasting potentiation of synaptic efficacy in the Bla-IC projection of anesthetized adult rats. This constitutes an *in vivo* demonstration of neurotrophin-induced potentiation of synaptic transmission in the neocortex. These findings support the concept that BDNF could be a synaptic messenger involved in activity-dependent synaptic plasticity.

© 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

*Theme:* C: Excitable membranes and synaptic transmission

*Topic:* Long-term potentiation; physiology

*Keywords:* Brain-derived neurotrophic factor; Long-term potentiation; Insular cortex; Basolateral amygdaloid nucleus; Trk receptor; Synaptic plasticity

Neurotrophins play diverse roles in regulating neuronal structure, function and survival during development and into adulthood [6,15,21,22]. Recent studies suggest that one of the neurotrophins, brain-derived neurotrophic factor (BDNF), plays a critical role in long-term synaptic plasticity in the adult brain [33]. BDNF acutely enhances glutamatergic synaptic transmission [19,20] and increases phosphorylation of the NR2B subunit of the *N*-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) in post-synaptic densities isolated from cortex and hippocampus [25]. NMDAR-dependent long-term potentiation (LTP) is associated with the upregulation of BDNF and its receptor TrkB in the hippocampus of awake freely moving rats [7,9], as well as in hippocampal slices [29]. In BDNF knockout mice, LTP is markedly impaired, but the changes are restored by either adenovirus-mediated transfection [23] or by the bath application of BDNF [30]. Moreover, application of exogenous BDNF to

slices enhances electrically induced LTP in rodent hippocampus [14]. In a series of studies using bath perfusion of BDNF onto hippocampal slices, Kang and Schuman [19,20] and Kang et al. [21] demonstrated long-lasting enhancement of transmission at Schaffer collateral-CA1 synapses. Furthermore, using intrahippocampal infusion of BDNF in the intact rat, a robust long-lasting potentiation has been observed at perforant path-granule cell synapse in the dentate gyrus [27,38].

BDNF and its high-affinity receptor TrkB are abundantly expressed in neurons of the neocortex of the mammalian brain [37]. BDNF influences the development of patterned connections and the growth and complexity of dendrites in the cerebral cortex [35,36]. Electrophysiological recordings made in slices obtained from visual cortex have implicated BDNF in synaptic plasticity during the critical period for the formation of ocular dominance columns [26]. BDNF participates in the activity-dependent scaling of cortical synaptic strength and adjusts the relative balance of cortical excitation and inhibition [32]. BDNF enhances the magnitude of LTP induced by tetanic stimulation in the visual cortex [1,16]. In addition, BDNF induces a long-lasting

\* Corresponding author. Tel.: +52-55-56220555x41227; fax: +52-55-56222310.

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

potentiation of synaptic transmission in the visual cortex of young rats both *in vitro* [1] and *in vivo* [17].

The insular cortex (IC) is a region of the temporal cortex in the rat that has been implicated in the acquisition and storage of different aversive learning tasks, such as conditioned taste aversion (CTA), spatial maze and inhibitory avoidance [3,4]. The IC receives direct projections from the basolateral (Bla) amygdaloid nucleus [3,5,24], and it is well established that both the amygdaloid complex and the IC contribute to the formation and retention of gustatory memories [3,5]. Recently, we showed that *in vivo* tetanic stimulation of the basolateral nucleus of the amygdala induced LTP in the insular cortex of adult rats, significantly increasing synaptic responses to low-frequency stimulation during a period of at least 1 h after training. Tetanus-induced LTP in this preparation was blocked by the application of NMDA receptor antagonists, suggesting that IC displays LTP through the activation of the NMDA receptors [11,12,13]. These results were confirmed by Jones et al. [18].

In the present study, we used acute intracortical infusion of BDNF to assess directly the effect of this neurotrophin on synaptic efficacy in the Bla-IC projection.

A total of 18 male Wistar rats, weighing 350–380 g, were used in this experiment. They were housed individ-

ually under a 12/12-h light–dark cycle, with food and water *ad libitum* and an average room temperature of 22 °C. IC responses were isolated similarly as previously described [11,13]. Briefly, animals were anesthetized with Nembutal (50 mg/kg, *i.p.*) and given supplemental Nembutal injections (25 mg/kg) at 1-h intervals to maintain a surgical level of anesthesia. Body temperature was maintained at 35° C with a heating pad. IC responses were recorded unilaterally by using a monopolar microinfusion electrode placed at the following stereotaxic coordinates (AP + 1.2 mm, ML 5.5 mm, DV  $-5.5 \pm 0.2$ ) [31]. Microinfusion electrodes consisted of 33-gauge stainless steel epoxytite-covered cannulae coupled to polyethylene tubing through a 26-gauge stainless steel ring, connected to a Teflon-coated stainless steel wire (0.005-in. diameter, Medwire, Chicago, IL). Polyethylene tubing was attached to a 10- $\mu$ l Hamilton syringe that was driven by a microinfusion pump (Carnegie Medicin, MA). Responses were evoked using a stainless steel bipolar electrode (0.005-in. diameter, Medwire) (Fig. 1) via direct and unilateral stimulation of the Bla at the following coordinates: AP  $-2.8$ , ML  $-5.0$ , DV  $-8.5 \pm 0.2$  [31]. Constant current stimulation (50–70  $\mu$ A monophasic pulses of 0.1–0.25 ms duration) was provided by a Grass S48 stimulator and delivered to the stimulating electrode through a Grass Stimulus Isolation

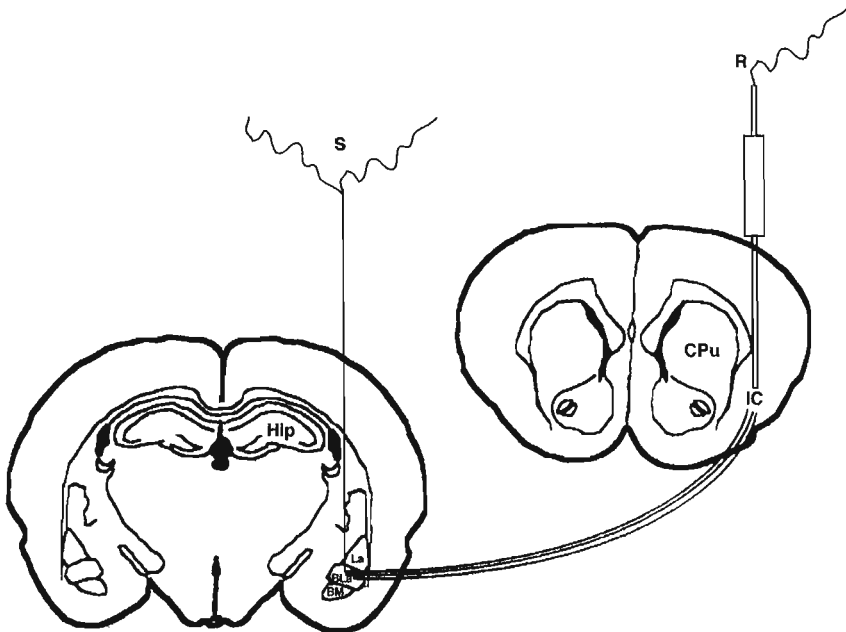


Fig. 1. Schematic representation of the amygdalo-cortical projections and the electrode placement, showing the stimulated (S) and recorded (R) sites in a coronal plane. La, lateral amygdaloid nucleus. Bla, basolateral amygdaloid nucleus. BM, basomedial amygdaloid nucleus. Cpu, caudate putamen. Hip, hippocampus. IC, insular cortex.



Unit (PSIU6). The evoked responses were amplified on a Grass P5 series A.C. preamplifier, filtered at 0.1–10 Hz, digitized (10 points/ms) and stored for offline analysis using BrainWave software (DataWave, Broomfield, CO). The IC-evoked responses were measured by obtaining the field EPSP slope measured 1–3 ms after the EPSP onset. The current intensity that elicited a 50% maximal response was determined and used for all subsequent stimulation. Low-frequency responses were then evoked once every 20 s throughout a 20-min baseline period, after which solutions were infused and evoked responses were collected for 3 h. EEG was monitored during the whole experiment. LTP was calculated as a percentage of change with respect to the mean slope of the field potentials before infusion.

The animals were divided into the following treatment groups: (1) vehicle group (VEH,  $n=4$ ), which underwent surgery, had electrodes implanted and received intracortical infusion of phosphate buffer solution (PBS, 3  $\mu$ l, 15 min) as vehicle after 20 min of baseline recording; (2) cytochrome *c* group (CYT-C,  $n=5$ ), which received the same treatment as the VEH group and PBS-containing recombinant cytochrome *c* from yeast, a protein with similar physical and chemical properties as BDNF (3  $\mu$ g/3  $\mu$ l, 15 min, Sigma, St. Louis, MO); (3) BDNF group (BDNF,  $n=5$ ), which received the same treatment as the VEH group and PBS-containing BDNF (3  $\mu$ g/3  $\mu$ l, 15 min, Alomone Labs., Jerusalem); and (4) BDNF plus K252a group (BDNF + K252a,  $n=4$ ), which received the same treatment as the BDNF group in combination with K252a, an inhibitor of Trk receptor tyrosine kinases (3  $\mu$ g of BDNF/3  $\mu$ l of K252a 20  $\mu$ M, 15 min, Alomone Labs.). K252a was prepared at a concentration of 20  $\mu$ M with dimethyl sulfoxide (DMSO) [17]. Upon completing the experiments, animals were histologically analyzed to verify the location of the injector tip. To clarify to what degree exogenously applied BDNF spread into the cortex around the recording electrode after the infusion for 15 min, the cortex was stained immunohistochemically with an anti-BDNF antibody in animals that were treated in a similar manner as the BDNF group. The insular cortex was sectioned in a microtome at 40  $\mu$ m thickness. The tissue was incubated with the primary anti-BDNF antibody (1:500; Sigma) in PBS containing 0.3% Triton X-100 for 3 days at 4 °C. Sections were washed three times as above and incubated with a biotinylated anti-mouse antibody (1:200) for 2 h in the same buffer as the primary antibody. The immunohistochemical reaction was developed using the Vectastain ABC Elite kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

The IC field EPSP consisted of small  $0.27 \pm 0.005$  mV (means  $\pm$  S.E.M.) potentials elicited with 50–70  $\mu$ A current pulses, and had an onset of 2–3 ms and a peak at approximately 7–9 ms, with an average slope of  $0.077 \pm 0.002$  (means  $\pm$  S.E.M.) in agreement with previous results [11,12,18]. After BDNF infusion, EPSP slope values were significantly elevated above baseline at 15 min, and climbed gradually to a stable plateau at 2 h. In the present experiments,

the maximum recording period after infusion was 3 h. No changes were observed in controls receiving only buffer medium, buffer containing cytochrome *c* or BDNF in combination with K252a (Fig. 2). Representative EPSP responses from IC during the stable plateau after BDNF infusion show an amplitude of  $0.44 \pm 0.003$  mV and slope of  $0.126 \pm 0.002$  (means  $\pm$  S.E.M.) (Fig. 2). ANOVA analysis for slope increases revealed highly significant differences between groups,  $F_{3,14} = 296.23$ ;  $p < 0.0001$ . The Fisher's test showed significant differences between the BDNF group and the all of the other groups ( $p < 0.0001$ ), but the VEH, CYT-C and BDNF + K252a groups were not statistically significant from each other. At 2 h post-infusion, the changes in EPSP slope for the BDNF, VEH, CYT-C and BDNF + K252a groups were  $163.73 \pm 0.48$ ,  $101.42 \pm 0.37$ ,  $99.36 \pm 0.56$  and

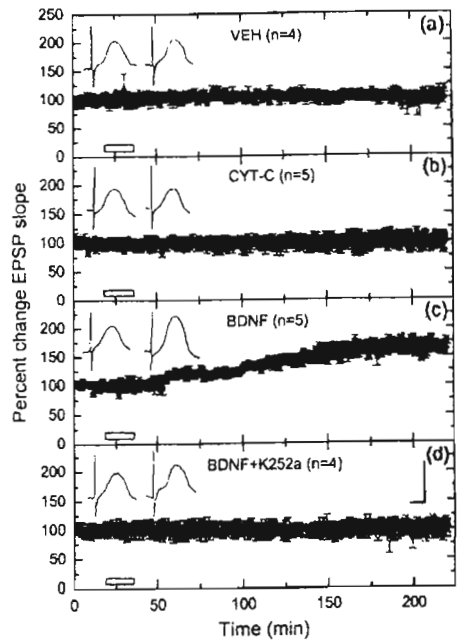


Fig. 2. Effects of acute brain-derived neurotrophic factor (BDNF) infusion on amygdalo-cortical (BlA-IC) responses in vivo. Plot of insular cortex evoked responses from animals that received PBS (VEH, a), cytochrome *c* (3  $\mu$ g/3  $\mu$ l) (CYT-C, b), BDNF (3  $\mu$ g/3  $\mu$ l) (BDNF, c) and BDNF + K252a (3  $\mu$ g/3  $\mu$ l) (BDNF + K252a, d). After BDNF infusion, EPSP slope values were significantly elevated above baseline at 15 min and climbed gradually to a stable plateau at 2 h. No changes were observed in the VEH, CYT-C and BDNF + K252a groups. The top of each graph shows IC field potentials (average of four sweeps) obtained immediately before and 170 min after the infusion. The percent change in EPSP slope for the VEH, CYT-C, BDNF + K252a and BDNF groups 2-h post-infusion were  $101.42 \pm 0.37$ ,  $99.36 \pm 0.56$ ,  $102.35 \pm 1.36$  and  $163.739 \pm 0.48$  (means  $\pm$  S.E.M.), respectively. Bars indicate the infusion period (15 min). Scale bar: 9 ms, 0.5 mV.

$102.35 \pm 1.36$  (means  $\pm$  S.E.M.), respectively. BDNF-induced potentiation was not associated with afterdischarges or other overt epileptiform activity as assessed by the continuously recorded neocortical EEG. To clarify to what degree exogenously applied BDNF spread into the cortex around the recording electrode after the infusion for 15 min, the cortex was stained immunohistochemically with an anti-BDNF antibody in animals treated in a similar manner as the BDNF group. Strong immunoreactivity was only seen around the BDNF infusion site (Fig. 3).

It is well known that BDNF plays an important role in activity-dependent cortical development and in the regulation of cortical excitability [1,8,17,26,32]. The present results show that acute intracortical microinfusion of BDNF potentiates transmission at the amygdalo-cortical projection (Bla-IC) of anesthetized adult rats. This constitutes an *in vivo* demonstration of neurotrophin-induced potentiation of synaptic transmission in the insular cortex, a neocortical region that has been implicated in the acquisition and storage of different aversive learning tasks [3,4,10,11,12]. The potentiation is robust and develops in the absence of

epileptiform activity. The present findings in the insular cortex *in vivo*, are in agreement with studies in which application of BDNF produced a potentiation of excitatory synaptic transmission in the visual cortex both *in vivo* and *in vitro* [1,8,17]. In these studies, a high concentration of BDNF produced an acute potentiation of basal excitatory synaptic transmission [8], and low concentrations of BDNF facilitated tetanus-induced LTP [1]. It is interesting to note that the studies in the visual cortex *in vivo* indicate that BDNF enhances excitatory synaptic transmission in young rats but not in adults [17]. In the present study, we found that acute intracortical infusion of BDNF in the IC potentiates transmission at the Bla-IC projection of anesthetized adult rats. This discrepancy may be due at least in part, to a differential distribution of TrkB receptor variants in the neocortex [17]. In fact, exogenously applied BDNF has a variety of effects that depend on the developmental stage of the preparation and the method of application. For instance, chronic effects on synaptic transmission appear to be different from acute actions and to require lower concentrations of neurotrophins [33]. In the present *in vivo* study, the potentiation was elicited by acute infusion of BDNF at doses similar to those used by Messaoudi et al. [27] and Ying et al. [38].

It is considered that memory processes involve short and long-term changes in synaptic communication, including alterations in electrical properties and structural modifications. As BDNF significantly modulates both forms of synaptic changes, it may play an important role in learning and memory [26,34,36]. Although the signaling pathways whereby BDNF/TrkB activation affects learning and memory formation remain to be determined, the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway appears to be involved [36]. In our experiments, BDNF did not potentiate synaptic transmission when it was applied in combination with K252a. This suggests that the long-lasting potentiation of field potentials by BDNF in the insular cortex is mediated by activation of Trk receptor tyrosine kinases. In this regard, recent experimental evidence indicates that BDNF/TrkB signaling converges on MAPK pathway through the activation of ERK (extracellular signal-regulated kinase) to enhance excitatory synaptic transmission *in vivo*, as well as, hippocampal-dependent learning in behaving animals [28,34,38]. In fact, the Bla-IC LTP elicits the activation of cortical ERK [18]. Previous findings demonstrated the involvement of the same molecular mechanisms in the same cortical area during taste learning [2]. Thus, synaptic and behavioral plasticity seems to share common molecular mechanisms in the insular cortex [18].

In summary, the present study shows that acute intracortical microinfusion of BDNF in anesthetized adult rats induces a lasting potentiation of synaptic efficacy in the insular cortex, an area that has been implicated in the acquisition and storage of different aversive learning tasks. These findings support the concept that BDNF plays an



Fig. 3. Tissue distribution of infused BDNF. Representative coronal section of the rat insular cortex showing the distribution of BDNF immunostaining at 15 min after BDNF microinfusion ( $3 \mu\text{g}/3 \mu\text{l}$ , 15 min). The cortical area into which BDNF diffused is stained dark. Cpu, caudate putamen. cc, Corpus callosum. Scale bar, 1 mm.

important role as synaptic messenger of activity-dependent synaptic plasticity in the adult neocortex *in vivo*.

### Acknowledgements

This research was supported by CONACYT 38511-M. We acknowledge Dr. Juan Carlos López for a critical reading of the manuscript.

### References

- [1] Y. Akaneya, T. Tsumoto, H. Hatanaka, Brain derived neurotrophic factor enhances long-term potentiation in rat visual cortex, *J. Neurosci.* 17 (1997) 6707–6716.
- [2] D.E. Berman, S. Hazvi, K. Rosenblum, R. Seger, Y. Dudai, Specific and differential activation of mitogen-activated protein kinases cascades by unfamiliar taste in the insular cortex of the behaving rat, *J. Neurosci.* 18 (1998) 10037–10044.
- [3] F. Bernúdez-Rattoni, J.L. McGaugh, Insular cortex and amygdala lesions differentially affect acquisition of inhibitory avoidance and conditioned taste aversion, *Brain Res.* 549 (1991) 165–170.
- [4] F. Bernúdez-Rattoni, C.E. Ormsby, M.L. Escobar, E. Hernández-Echeagaray, The role of insular cortex in the acquisition and long lasting memory for aversively motivated behaviors, in: J.L. McGaugh, F. Bernúdez, R.A. Prado-Alcalá (Eds.), *Plasticity in the Central Nervous System: Learning and Memory*, Lawrence Erlbaum Associates, Hillsdale, NJ, 1995, pp. 67–82.
- [5] F. Bernúdez-Rattoni, I.B. Introini-Collison, K. Coleman-Mesch, J.L. McGaugh, Insular cortex and amygdala lesions induced after aversive training impair retention: effects of degree of training, *Neurobiol. Learn. Mem.* 67 (1997) 57–63.
- [6] M. Bibel, Y.A. Barde, Neurotrophins key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system, *Genes Dev.* 14 (2000) 2919–2937.
- [7] C.R. Bramham, T. Southard, J.M. Sarvey, M. Herkenham, L.S. Brady, Unilateral LTP triggers bilateral increases in hippocampal neurotrophin and trk receptor mRNA expression in behaving rats: evidence for interhemispheric communication, *J. Comp. Neurol.* 368 (1996) 371–382.
- [8] G. Carmignoto, T. Pizzorusso, S. Tia, S. Vicini, Brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor potentiate excitatory synaptic transmission in the rat visual cortex, *J. Physiol.* 498 (1997) 153–164.
- [9] M. Draganow, P. Hughes, S.E. Mason-Parker, P. Lawlor, W.C. Abraham, TrkB expression in dentate granule cells is associated with a late phase of long-term potentiation, *Mol. Brain Res.* 46 (1997) 274–280.
- [10] M.L. Escobar, F. Bernúdez-Rattoni, Long-term potentiation in the insular cortex enhances conditioned taste aversion retention, *Brain Res.* 852 (2000) 208–212.
- [11] M.L. Escobar, V. Chao, F. Bernúdez-Rattoni, *In vivo* long term potentiation in the insular cortex: NMDA receptor dependence, *Brain Res.* 779 (1998) 314–319.
- [12] M.L. Escobar, I. Alcocer, V. Chao, The NMDA receptor antagonist CPP impairs conditioned taste aversion and insular cortex long-term potentiation *in vivo*, *Brain Res.* 812 (1998) 246–251.
- [13] M.L. Escobar, I. Alcocer, F. Bernúdez-Rattoni, *In vivo* effects of intracortical administration of NMDA and metabotropic glutamate receptors antagonists on neocortical long-term potentiation and conditioned taste aversion, *Behav. Brain Res.* 129 (2002) 101–106.
- [14] A. Figueroa, L.D. Pozzo-Miller, P. Olafsson, T. Wang, B. Liu, Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus, *Nature* 381 (1996) 706–709.
- [15] E.J. Huang, L.F. Reichardt, Neurotrophins: roles in neuronal development and function, *Annu. Rev. Neurosci.* 24 (2001) 677–736.
- [16] K.M. Huber, N.B. Sawtell, M.F. Bear, Brain derived neurotrophic factor alters the synaptic modification threshold in visual cortex, *Neuropharmacology* 37 (1998) 571–579.
- [17] B. Jiang, Y. Akaneya, M. Ohshima, S. Ichisaka, Y. Hata, T. Tsumoto, Brain derived neurotrophic factor induces long-lasting potentiation of synaptic transmission in visual cortex *in vivo* in young rats, but not in the adult, *Eur. J. Neurosci.* 14 (2001) 1219–1228.
- [18] M.W. Jones, P.J. French, T.V.P. Bliss, K. Rosenblum, Molecular mechanisms of long-term potentiation in the insular cortex *in vivo*, *J. Neurosci.* 19 (1999) 1–8.
- [19] H. Kang, M. Schuman, Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus, *Science* 267 (1995) 1658–1662.
- [20] H. Kang, M. Schuman, A requirement for local protein synthesis in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity, *Science* 273 (1996) 1402–1406.
- [21] H. Kang, A.A. Welcher, D. Shelton, E.M. Schuman, Neurotrophins and time: different roles for TrkB signaling in hippocampal long-term potentiation, *Neuron* 19 (1997) 653–664.
- [22] D.R. Kaplan, F.D. Miller, Neurotrophin signal transduction in the nervous system, *Curr. Opin. Neurobiol.* 10 (2000) 381–391.
- [23] M. Korte, P. Caroll, F. Wolf, G. Brem, H. Thoenen, T. Bonhoeffer, Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 (1995) 8856–8860.
- [24] J.F. Krettek, J.L. Price, A direct input from the amygdala to the thalamus and the cerebral cortex, *Brain Res.* 67 (1974) 169–174.
- [25] S.Y. Lin, K. Wu, E.S. Levine, H.T.J. Mount, P.C. Suen, I.B. Black, BDNF acutely increases tyrosine phosphorylation of the NMDA receptor subunit 2B in cortical and hippocampal postsynaptic densities, *Mol. Brain Res.* 55 (1998) 20–27.
- [26] A.K. McAllister, L.C. Katz, D.C. Lo, Neurotrophins and synaptic plasticity, *Annu. Rev. Neurosci.* 22 (1999) 295–318.
- [27] E. Messaoudi, K. Bardsen, B. Srebro, C. Bramham, Acute intrahippocampal infusion of BDNF induces lasting potentiation of synaptic transmission in the rat dentate gyrus, *J. Neurophysiol.* 79 (1998) 496–499.
- [28] E. Messaoudi, S.W. Ying, T. Kanherua, D.D. Croll, C.R. Bramham, BDNF triggers transcription-dependent, late phase LTP *in vivo*, *J. Neurosci.* 22 (2002) 7453–7461.
- [29] S.L. Patterson, L.M. Grover, P.A. Schwartzkroin, M. Bothwell, Neurotrophin expression in rat hippocampal slices: a stimulus paradigm inducing LTP in CA1 evokes increases in BDNF and NT-3 mRNAs, *Neuron* 9 (1992) 1081–1088.
- [30] S.L. Patterson, T. Abel, T.A.S. Deuel, K.C. Martin, J.C. Rose, E.R. Kandel, Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice, *Neuron* 16 (1996) 1137–1145.
- [31] G. Paxinos, C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, Orlando, 1986.
- [32] L.C. Rutherford, S.B. Nelson, G.G. Turigiano, BDNF has opposite effects on the quantal amplitude of pyramidal neuron and interneuron excitatory synapses, *Neuron* 21 (1998) 521–530.
- [33] A.F. Schinder, M.M. Poo, The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity, *Trends Neurosci.* 23 (2000) 639–645.
- [34] W.J. Tyler, M. Alonso, C.R. Bramham, L.D. Pozzo-Miller, From acquisition to consolidation: brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal dependent learning, *Learn. Mem.* 9 (2002) 224–237.
- [35] B. Xu, K. Zhang, N.L. Ruff, Y.A. Zhang, S.K. McConnell, M.P. Stryker, L.F. Reichardt, Cortical degeneration in the absence of neurotrophin signaling: dendritic retraction and neuronal loss after removal of the receptor TrkB, *Neuron* 26 (2000) 233–245.
- [36] K. Yamada, M. Mizuno, T. Nabeshima, Role for brain-derived neurotrophic factor in learning and memory, *Life Sci.* 70 (2002) 735–744.

- [37] Q. Yan, R.D. Rosenfeld, C.R. Matheson, N. Hawkins, O.T. Lopez, L. Bennet, A.A. Welcher, Expression of brain derived neurotrophic factor protein in the adult rat central nervous system, *Neuroscience* 78 (1997) 431–448.
- [38] S.W. Ying, M. Futter, K. Rosenblum, M.J. Weber, S.P. Hunt, T.V.P. Bliss, C.R. Bramham, Brain derived neurotrophic factor induces long-term potentiation in intact adult hippocampus: requirement for ERK activation coupled to CREB and upregulation of Arc synthesis, *J. Neurosci.* 22 (2002) 1532–1540.