



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

**“CURSO TEMPORAL DE LOS EFECTOS DEL FACTOR NEUOTRÓFICO DERIVADO
DEL CEREBRO SOBRE LA CONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA EN LA CORTEZA
INSULAR.”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADA EN PSICOLOGÍA

PRESENTA

ARACELI MARTÍNEZ MORENO

DIRECTORA DE TESIS

DRA. MARTHA L. ESCOBAR RODRÍGUEZ

REVISOR DE TESIS: DR. JULIO EDUARDO ROQUE MORÁN ANDRADE

MÉXICO, D. F.

2010



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.

AGRADECIMIENTOS

Concluye una etapa de mi vida en la cual he crecido tanto personal como académicamente y tengo presente que debo agradecer a las personas que han contribuido con este crecimiento, sin ellas, no hubiese sido posible.

En primera instancia agradezco a la máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México por generar los recursos que contribuyen al conocimiento e impulsan el desarrollo de este país. A mis profesores que desde los primeros semestres despertaron en mí la curiosidad científica y me enseñaron las maravillas sobre la capacidad plástica de nuestro cerebro.

A mis padres Javier y Juana por brindarme en todo momento su apoyo y motivarme a alcanzar mis objetivos. A mi hermana Gaby porque desde pequeña me mostró que puedo alcanzar algo si me lo propongo, que no debo darme por vencida y levantarme si me encuentro caída. A mis hermanos Javier y Arturo por recordarme siempre que pueden ayudarme en el momento que los necesite y el valor de una familia unida.

A la Dra. Martha Escobar por despertar en mí el interés y necesidad de comprender los mecanismos que sustentan las propiedades plásticas de la memoria (sin dejar de lado lo que ocurre a nivel de sistema), por enseñarme a jugar y divertirme con mi trabajo, siempre de una forma limpia, ética y responsable, y por transmitirme el amor y compromiso hacia la investigación. A mis compañeros de laboratorio (Andrea, Luis, Laura, Diana y por supuesto Minerva) quienes estuvieron dispuestos a apoyarme en todo momento en mi formación dentro de la investigación, tanto en la práctica como a generarme preguntas para buscar respuestas empíricamente.

A mi novio Javier por comprenderme, apoyarme y ayudarme a mejorar como persona, por enseñarme a cada momento algo nuevo, por las sonrisas que me hace desbordar, por una infinidad de motivos... Te quiero.

A la memoria de mis abuelos Lucio, Dolores y Melecia, por fundar los cimientos que me forjaron, sobre todo a mi abue Pedro, del cual conservo aún intactos recuerdos de la infancia; estoy segura que ellos sembraron en mí el granito de la curiosidad que me llevó a adentrarme al mundo de las Neurociencias.

Gracias a mis mejores amigas de la fac, Diana y Anabel, porque juntas pasamos por importantes momentos en nuestras vidas, y por las noches de desvelo que pasamos, todas bastante gratificantes.

Puedo agradecer a todas estas personas porque conservo el recuerdo de los momentos que he vivido con cada una de ellas, porque después de todo, **nosotros somos nuestra memoria, nuestra historia.**

“... WE ARE, AFTER ALL, OUR MEMORIES...!”

Mc Gaugh

RESUMEN

Desde la perspectiva de las neurociencias, el aprendizaje es definido como la adquisición de nueva información, en tanto que la memoria es el proceso mediante el cual dicha información es almacenada (Bear et al., 2001). Según Baddeley, la memoria consta de las siguientes fases: adquisición, consolidación y evocación (Baddeley, 2001, citado por Riegler, 2005; Bear, 2001). Numerosas evidencias experimentales muestran que la síntesis de nuevas proteínas es necesaria durante la fase de consolidación (Nader y Hardt, 2009; Dudai, 2002; Barrientos et al., 2002; Kandel, 2001; Davis y Squire, 1984; McGaugh, 1966). Recientemente se ha observado que la síntesis proteica *de novo* es requerida en diversas fases temporales después de la adquisición, puesto que la administración de inhibidores de síntesis de proteínas en periodos prolongados después del entrenamiento deteriora la persistencia del trazo mnémico (Igaz et al., 2002; Romero-Granados et al., 2010). Sin embargo, esta cuestión aún no ha sido explorada en regiones neocorticales como la corteza insular, considerada el relevo final de la vía gustativa. El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés) es una neurotrofina que ha emergido como potente mediador molecular de los procesos celulares que subyacen al almacenamiento de información. Recientemente se ha observado que la microinfusión intrahipocámpal e intracortical de BDNF es capaz de revertir el déficit sobre la consolidación de información, ocasionado por la administración de un inhibidor de la síntesis de proteínas (Bekinschtein et al., 2008; Moguel-González et al., 2008). Por lo anterior, el objetivo general de la presente investigación fue identificar diferentes ventanas temporales en las cuales se requiere de síntesis proteica *de novo* que coadyuve al almacenamiento de la información aversiva al sabor por periodos prolongados, así como analizar la participación del BDNF durante tales procesos. La memoria aversiva fue evaluada a través del paradigma de condicionamiento aversivo a los sabores (CAS). El proyecto se dividió en dos fases experimentales dentro de las cuales se establecieron objetivos particulares. Durante la primera fase se exploraron ventanas temporales específicas: a las 3, 5, 7 y 12 horas post adquisición del CAS con el fin de ubicar aquellas en las cuales se requiere de síntesis de nuevas proteínas para el mantenimiento de la información aversiva al sabor, para lo cual se empleó anisomicina (un inhibidor que bloquea la actividad de la peptidil transferasa en el ribosoma, impidiendo de esta manera la síntesis de proteínas). En la segunda fase, se analizaron las ventanas temporales que resultaron susceptibles al tratamiento con anisomicina evaluando la participación del BDNF en la persistencia de la memoria de largo plazo del CAS. Nuestros resultados revelan que a las 5 y 7 horas después de la adquisición del CAS se requiere de síntesis de nuevas proteínas para el mantenimiento de la memoria aversiva al sabor. Asimismo, se observa que la administración de BDNF dentro de las citadas ventanas temporales revierte el déficit en la memoria ocasionado por la anisomicina. La presente investigación muestra evidencia de que la síntesis de nuevas proteínas es requerida en regiones neocorticales como la corteza insular, incluso horas después de que la información ha sido consolidada. De igual manera, muestra que el BDNF es un producto esencial de estas oleadas de síntesis proteica y una neurotrofina fundamental para la persistencia de la memoria.

ÍNDICE

1. Introducción.	1
2. Antecedentes	2
2.1. Aprendizaje y memoria: Consolidación	2
2.2. Condicionamiento aversivo a los sabores (CAS)	8
2.3. El CAS y la corteza insular	10
2.4. Neurotrofinas	13
2.5. El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)	16
2.6. BDNF y memoria	19
2.7. Vías de señalización del BDNF	22
3. Planteamiento del problema	27
4. Objetivo general	28
4.1. Objetivos particulares	29
5. Hipótesis	29
6. Metodología	30
6.1. Sujetos	30
6.2. Procedimiento experimental	30
6.2.1. Implantación de cánulas y microinfusión	30
6.2.2. Paradigma conductual: Condicionamiento aversivo a los sabores (CAS)	32
6.2.3. Histoquímica de Nissl	32
7. Diseño experimental.	33
7.1. Fase I	33
7.2. Fase II	34
7.3. Análisis de resultados	36
8. Resultados	37
8.1. Resultados conductuales FASE I	37
8.2. Resultados conductuales FASE II	39
8.3. Resultados histológicos	42
9. Discusión y conclusiones	43
10. Referencias	51

1. INTRODUCCIÓN

A lo largo de la evolución, el hombre y otras especies han sufrido varias modificaciones estructurales y funcionales en su Sistema Nervioso que les han permitido subsistir debido a su aptitud para vencer la presión de la selección natural. Todo ello se da gracias a la capacidad de las células (y del sistema en sí) para adaptarse a cambios en el ambiente externo o interno, a la experiencia previa, o a las lesiones. Cuando este fenómeno tiene lugar en el Sistema Nervioso Central (SNC) se le denomina plasticidad cerebral (Gispén, 1993).

Esta adaptación al medio es factible debido a los procesos de aprendizaje y memoria que poseen los organismos, ya sea vertebrados o invertebrados. Así, para los fines de esta investigación, únicamente abordaremos el tema de la plasticidad cerebral desde la perspectiva de dichos procesos. El estudio de los mecanismos plásticos sobre los cuales se sustentan el aprendizaje y la memoria se realiza desde varios niveles de análisis, y ha sido posible gracias a la generación de diversos paradigmas y modelos importantes para su evaluación a nivel conductual; así como al avance en disciplinas como la biología molecular y la bioquímica, que nos han permitido develar los mecanismos moleculares que subyacen a estos procesos. En el presente estudio empleamos el paradigma de condicionamiento aversivo a los sabores (CAS), para identificar diferentes ventanas temporales en las cuales se requiere de síntesis de nuevas proteínas que contribuya al mantenimiento de la memoria aversiva al sabor por periodos prolongados. Analizando asimismo la participación del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés) durante tales procesos.

2. ANTECEDENTES

2.1. *Aprendizaje y memoria: Consolidación*

El aprendizaje es el nombre que se le da al proceso por el cual se adquiere nueva información y es observado a través de los cambios potenciales o relativamente permanentes. Por su parte, la memoria es definida como retención de la información previamente aprendida (Bear et al., 2001). Para su estudio, la memoria ha sido categorizada con base en una línea temporal, así como en términos cualitativos de la información (Figura 1). Por su parte, Baddeley indica que una de las fases de las que consta la memoria es la consolidación (Baddeley, 2001, citado por Riegler, 2005).

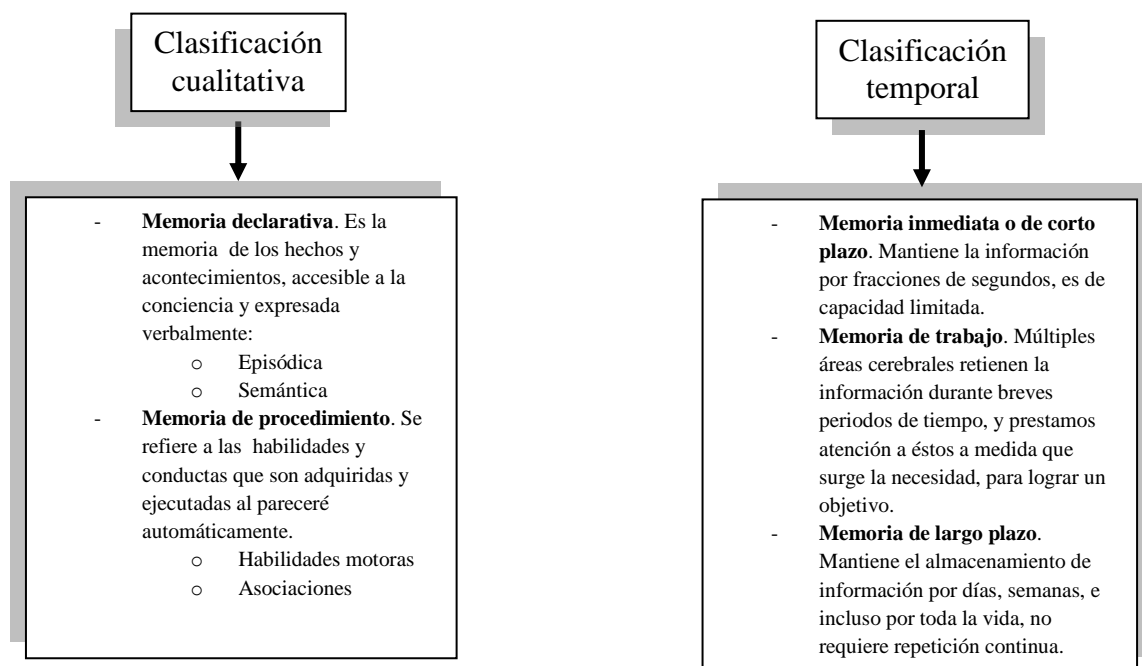


Figura 1. Clasificación temporal y cualitativa de la memoria (Bear et al., 2001).

Diversos hallazgos reportan que después de la adquisición, la memoria pasa por un periodo en el cual es susceptible de ser alterada por la administración de fármacos

como los barbitúricos (McGaugh, 1966), aplicación de electro shocks (Leonard y Zavala, 1964), así como distractores, traumas cráneo encefálicos o lesiones en áreas del cerebro implicadas en el almacenamiento de la información, como la amígdala (Dudai, 1996). Dichas observaciones experimentales, los casos clínicos, así como los modelos experimentales generados que han permitido el estudio de las diferentes fases de la memoria, han favorecido la idea de que la memoria es almacenada a corto plazo y selectivamente trasladada a un almacén de largo plazo a través de un proceso al cual se le ha denominado consolidación, siendo ésta una etapa de transición entre la memoria de corto a largo plazo.

La consolidación es definida como un proceso de estabilización, dependiente del tiempo, que favorece eventualmente un almacén permanente de una memoria adquirida (Nader y Hardt, 2009). Durante esta fase, nuevas memorias son susceptibles de ser alteradas y una memoria nueva, inicialmente frágil, es transformada en una memoria estable y robusta (Robertson et al., 2004). La propuesta del requerimiento de esta fase para generar un trazo de memoria estable se desarrolló desde principios del siglo XX con Müller y Pilzecker, quienes propusieron que la formación de una memoria permanente toma tiempo, y que durante este tiempo, la memoria es vulnerable de ser interrumpida (Muller y Pilzecker, 1900; citado por Bekinschtein, 2007). Se ha mostrado que la memoria no es un proceso único, al menos en los vertebrados se divide en dos fases.

- 1) Independiente de síntesis de proteínas que en términos temporales es corta con respecto a la otra fase, denominada memoria de corto plazo.
- 2) Dependiente de síntesis de proteínas, y/o de la transcripción de ARNm (ácido desoxiribonucleico mensajero), que implica una retención de la información durante tiempos más prolongados, denominado a esta fase memoria de largo plazo. Esta fase es sensible a la administración de inhibidores de síntesis de proteínas.

Asimismo, la consolidación se divide en dos tipos: *consolidación a nivel celular o sináptico*, la cual es rápida e implica eventos moleculares y celulares tempranos que

ocurren inmediatamente después del entrenamiento y no van más allá de horas o días; y *consolidación de sistemas*, que es lenta e implica la participación de diferentes regiones neocorticales y su interacción con estructuras del lóbulo temporal medial reorganiza el material de información reciente (Medina et al., 2008).

El empleo de fármacos posteriores a la fase de adquisición, como inhibidores de síntesis de proteínas tales como la cicloheximida, puromicina y emetina (Alberini, 2008) han revelado que la inhibición de síntesis de proteínas no impide la adquisición de la tarea, sin embargo, deteriora el establecimiento a largo plazo de la información. Dichos estudios apoyan la idea de que hay dos fases de memoria: una fase de corto plazo y una de largo plazo, y que la síntesis de nuevas proteínas es requerida para la consolidación (McGaugh, 2000; Dudai y Eisenberg, 2004).

La anisomicina es un inhibidor potente, estructuralmente específico y reversible que bloquea la actividad metabólica y los efectos fisiológicos de las peptidil transferasas, las cuales son enzimas que catalizan la adición de aminoácidos para la formación de péptidos durante la síntesis proteica, por lo que su administración, al inhibir el proceso de transcripción, impide la síntesis de nuevas proteínas requeridas para la consolidación del aprendizaje de una tarea (Grollman, 1967; Figura 2). Con relación a esto, diversos grupos de investigación han estudiado a fondo las propiedades de la anisomicina, así como su contribución en el deterioro de la memoria durante diversos paradigmas de aprendizaje. En este sentido, se ha demostrado que este inhibidor tiene un periodo de actividad de varias horas, cuyo pico de acción para alcanzar la inhibición del 90% de la síntesis proteica está entre los 20 y 30 minutos después de su administración (Davis y Squire, 1984; Rosenblum et al., 1993). Recientemente se ha observado que la infusión de anisomicina en diferentes regiones corticales, varía en cuanto a su periodo de actividad, dependiendo del tipo de administración que se realice. Por ejemplo, el efecto de la inyección intraperitoneal de anisomicina es revertido hasta por 6 horas después de su administración, mientras que tanto la administración subcutánea

como la microinfusión local en el hipocampo, impiden la síntesis de nuevas proteínas hasta por 9 horas (Wanisch y Wotjak, 2008). Varios estudios demuestran que la administración de inhibidores de síntesis de proteínas, como la anisomicina, produce un deterioro en la fase de consolidación de la memoria (Nader y Hardt, 2009; Dudai, 2002; Barrientos et al., 2002; Kandel, 2001; Davis y Squire, 1984; McGaugh, 1966). Al ser administrada en regiones como el núcleo lateral de la amígdala, interfiere con la consolidación del condicionamiento al miedo (Schafe y LeDoux, 2000); mientras que su infusión intrahipocámpal ocasiona un déficit en la memoria espacial (Rodríguez-Ortiz et al., 2008). De igual forma, su administración en la corteza insular deteriora la memoria al sabor (Rosenblum et al., 1993).

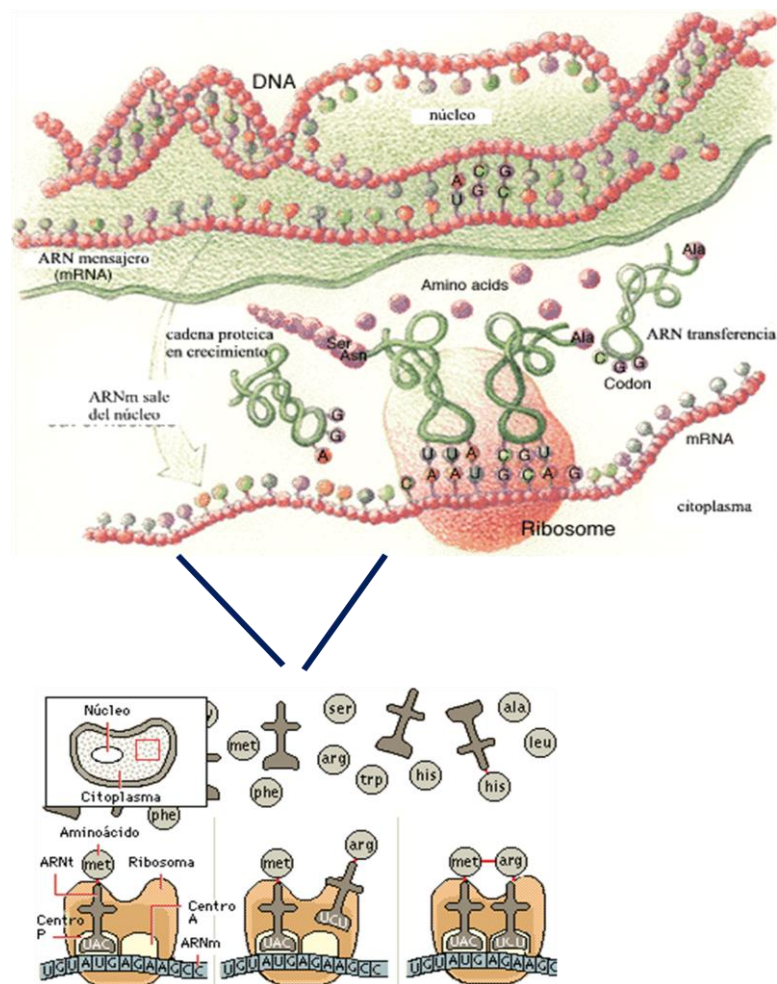


Figura 2. Proceso de síntesis de proteínas en donde se observa la función de las enzimas peptidil transferasas. Se observa en la figura los diversos pasos de los cuales consta la síntesis de proteínas. En la parte superior de la figura se observa la fase de transcripción, la cual es el proceso de copiado de la información contenida en el ADN cromosomal durante la síntesis de ARN mensajero (ARNm). El ARNm llega a los ribosomas en donde se hace una lectura de la información contenida para comenzar la síntesis de proteínas, proceso que es denominado traducción. Dentro de la fase de traducción, específicamente durante la elongación de la cadena polipeptídica (la cual es inducida por la activación de las enzimas peptidil transferasas), la anisomicina actúa bloqueando la actividad metabólica y los efectos fisiológicos de estas enzimas (Raven et al., 2006).

Los estudios experimentales que revelaron la importancia de la síntesis proteica *de novo* para la fase de consolidación, sólo se habían realizado a través de la administración de inhibidores de síntesis de proteínas en tiempos cercanos al entrenamiento o antes de la adquisición. En años recientes ha surgido una teoría denominada reactivación sináptica propuesta por Tsien y Wittenberg, dentro de la cual se postula la existencia de circuitos de retroalimentación proteica en ventanas temporales específicas, que permite el fortalecimiento del trazo mnémico y por ende, el almacenamiento de información por periodos prolongados. Según estos autores, un solo evento molecular después de la adquisición de la información no es suficiente para la estabilización de la memoria por periodos prolongados principalmente por tres razones: 1) la mediación de la consolidación de la memoria de largo plazo a cargo del hipocampo, ocurre en una fase temporal de semanas en ratones (Anagnostaras et al., 1999; Kim y Fanselow, 1992; Riedel et al., 1999; Zola-Morgan y Squire, 1990; citados por Tsien y Wittenberg, 2002) y de años en humanos (Kritchevsky y Squire, 1989; Squire et al., 1989; Haist et al., 2001; citados por Tsien y Wittenberg, 2002); 2) aunque la inhibición de síntesis de proteínas produce un déficit en la memoria de largo plazo, fenómenos como la recuperación espontánea favorecen el rescate de la memoria sobre un curso temporal de semanas, como se ha reportado en estudios con animales amnésicos; 3) las estructuras sinápticas en el cerebro adulto no son estacionarias y las proteínas son producidas reiteradamente (Tsien y Wittenberg, 2002). Es importante mencionar que la hipótesis central de la “reactivación sináptica” indica que un reforzamiento repetido de las modificaciones sinápticas post-entrenamiento, denominado reentrada de reforzamiento sináptico, es esencial para la consolidación y el mantenimiento de la memoria en el largo plazo. En este sentido, la reactivación de un ensamble neural en el hipocampo durante el periodo de consolidación resulta en múltiples circuitos de reforzamiento sináptico que requieren de la reactivación de los receptores NMDA¹ (entre otras proteínas) durante las semanas iniciales después del entrenamiento (Wittenberg, et al., 2002).

¹ Los receptores NMDA. N-metil-D-aspartato son un subtipo de receptores glutamatérgicos permeables al Na⁺, K⁺ y Ca²⁺.

En apoyo a esta teoría han surgido varios trabajos, como el de Igaz y colaboradores en el 2002, en el cual demuestran que para que la memoria aversiva se mantenga en el largo plazo se requiere de la síntesis de ARNm durante dos fases temporales: la primera se presenta inmediatamente después del entrenamiento, mientras que la segunda tiene lugar entre las 3 y 6 horas después de la adquisición. Por su parte, Bekinschtein y colaboradores en el 2007 encontraron que la persistencia de la memoria aversiva requiere de una fase dependiente de síntesis de proteínas que se da en el hipocampo y que tiene lugar 12 horas después de la adquisición. En el mismo sentido, algunos reportes señalan que además de al momento del entrenamiento o antes de éste, una segunda ventana de tiempo de síntesis de proteínas se encuentra relacionada con la permanencia de la memoria. Esta ventana abarca de las 4 a las 5 hrs después del entrenamiento en los paradigmas de discriminación del brillo en ratas (Grecksch y Matthies, 1980) y evitación pasiva en pollos (Freeman et al., 1995). De igual forma, Romero-Granados y colaboradores (2009), reportaron que la administración sistémica de anisomicina afecta el mantenimiento de la memoria de reconocimiento de un objeto, luego de que este inhibidor se administra 30 minutos antes, durante, o 4 horas después del entrenamiento. Sin embargo, contrario a estos hallazgos, Meiri y Rosenblum (1998) reportan que la anisomicina sólo tiene efecto cuando es administrada 20 minutos antes del desempeño de la tarea y no en otra ventana de tiempo antes o después de la evaluación.

Como hemos visto, los estudios reportados hasta el momento han replanteado la idea sobre concebir a la fase de consolidación de la memoria como un proceso unitario y referirnos a él más bien como un proceso reiterativo que requiere de una reactivación constante de síntesis proteica.

2.2. *Condicionamiento aversivo a los sabores (CAS)*

El proceso de aprendizaje ocurre en varias especies y en diferentes circunstancias. Debido a ello se ha generado una clasificación de este proceso dentro de la cual se encuentran: a) el *aprendizaje no asociativo*, en el que los organismos se habitúan o sensibilizan a los estímulos; b) el *aprendizaje incidental y procesos relacionados*, aquí el término “incidental” significa la ausencia de una situación instructiva identificable, así el aprendizaje ocurre porque la situación tiene una importancia potencial significativa; c) el *aprendizaje asociativo*, en donde los organismos aprenden relaciones entre eventos en el mundo, incluso entre estímulos, o entre estímulos y acciones (Dudai, 1989). El estudio a nivel conductual de los procesos de aprendizaje y memoria ha sido posible gracias al desarrollo de una gran diversidad de paradigmas. En este sentido, un paradigma para evaluar la memoria aversiva es el condicionamiento aversivo a los sabores (CAS). Este es un condicionamiento asociativo donde el sabor sirve como estímulo condicionado y el malestar gástrico como estímulo incondicionado, de manera que un estímulo gustativo adquiere la capacidad de inducir una respuesta condicionada. Este tipo de condicionamiento es relevante porque la supervivencia de un organismo está basada, entre otras cosas, en la capacidad de aprender y recordar que un alimento ingerido fue seguido de un malestar, y de esta forma predecir el potencial dañino de cualquier otro alimento que tenga atributos similares evitando su consumo. John García y colaboradores (1955) describieron por primera vez que las ratas desarrollan aversión a soluciones dulces cuando éstas son seguidas de la aplicación de rayos gamma. Posteriormente, el estímulo aversivo utilizado fue el cloruro de litio (LiCl), el cual produce un malestar gástrico debido a la activación del nervio vago y esplénico. Al respecto, García y Koellin en 1966 demostraron que una solución con sabor se asocia más fácilmente a la inducción de la náusea que la aplicación de choques eléctricos en las patas de los roedores; esto indica que en este tipo de condicionamiento, donde el estímulo condicionado es el sabor, es importante que el estímulo aversivo sea de tipo visceral (García y Koellin, 1966).

Los animales pueden aprender el CAS si la solución con sabor es ingerida espontáneamente, pero también presentan el aprendizaje de la tarea cuando el estímulo aversivo es inyectado vía intraperitoneal (i. p.) o intravenosa (i. v.) (Bures y Buresova, 1989; Bradley y Mistretta, 1971). En las siguientes líneas, se presentan los principios generales del CAS:

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

Varios estudios han demostrado que lesiones bilaterales de la corteza insular antes o después de la adquisición del CAS deterioran el aprendizaje o la evocación (McGowan et al., 1972; Bermúdez-Rattoni y Yamamoto, 1998), sin embargo, no parece afectar la percepción del sabor, puesto que los animales pueden discriminar entre diferentes concentraciones de sacarosa y NaCl (Lasiter et al., 1985). Como se observa en la literatura, este paradigma ha sido utilizado ampliamente debido a su relevancia evolutiva, pues como lo indiqué al principio del apartado, la ingesta de alimento es clave para la sobrevivencia de todo organismo. Además, basta sólo un ensayo o exposición al estímulo incondicionado para que la adquisición del condicionamiento tenga lugar, aunado a que la vía por la cual la información gustativa es procesada está bien descrita, como lo observamos en el siguiente apartado.

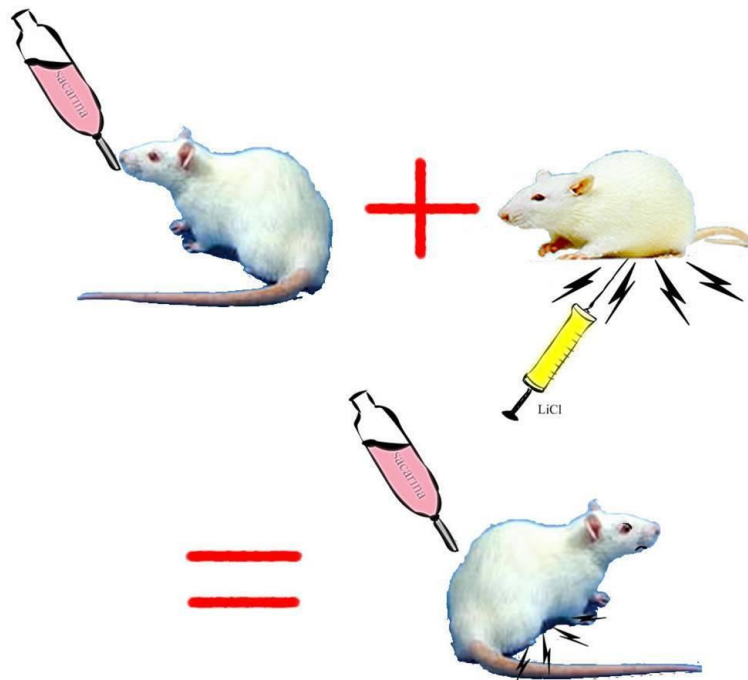


Figura 3. Condicionamiento aversivo a los sabores. Cuando se para un sabor novedoso con un malestar gástrico (debido a una inyección i. p. de LiCl) y ocurre la asociación entre estímulos, la siguiente vez que el organismo sea expuesto al sabor evocará el malestar gástrico. Esto ocasiona que el animal exhiba una aversión a dicho sabor evitando su consumo.

2.3. *El CAS y la corteza insular*

La corteza insular (CI), o corteza gustativa como también se le conoce, es una región cortical localizada bilateralmente en el cerebro sobre la parte posterior del lóbulo frontal y la parte anterior del lóbulo temporal. Está constituida por cinco a siete giros oblicuos y se divide en tres regiones: anterior (principalmente agranular), medial y posterior (con sub regiones disgranular y granular respectivamente) (Figura 4). Presenta conexiones anteriores con la corteza orbitofrontal y posteriores con la corteza temporal superior. Su interconexión con estructuras subcorticales, como el sistema límbico y los ganglios basales, sustentan su participación en la representación e integración de señalizaciones viscerales y autónomas, como la gustativa, cuya representación se ve localizada principalmente en la ínsula posterior

(Singer et al., 2009; Craig, 2009). De esta forma, su actividad se ha visto involucrada en el procesamiento y, por ende, en el almacenamiento de diversos

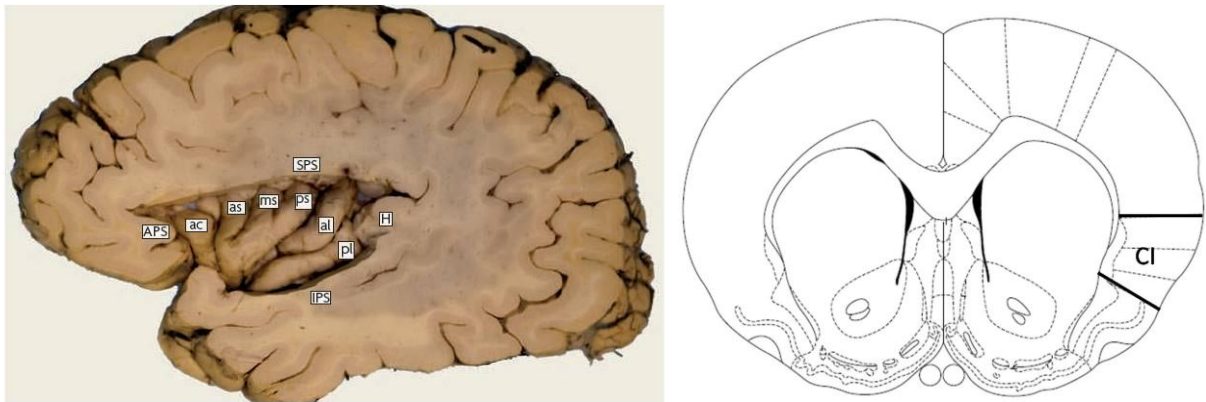


Figura 4. Corteza insular. En la parte izquierda de la figura se puede observar una fotografía en corte sagital de la corteza insular de un paciente humano. Abreviaturas: as, giro insular anterior corto; al, giro insular anterior largo; ac, giro accesorio; APS, surco anterior peri-insular; H, giro de Heschl; IPS, giro inferior peri-insular; ms, giro insular medial corto; ps, giro insular posterior corto; pl, giro insular posterior largo; SPS, surco superior peri-insular. En la parte derecha se observa un esquema de la corteza insular, un corte coronal de un cerebro de rata en donde puede observarse la ubicación de la corteza insular (CI) (Fotografía, cortesía del Profesor Thomas P. Naidich, del Centro Médico del Monte Sinaí, New York; citado por Craig, 2009; Paxinos et al., 1995).

paradigmas de aprendizaje tales como prevención pasiva, tareas de reconocimiento, y el CAS (Bermúdez-Rattoni y McGaugh, 1991). Específicamente, y con apoyo de estudios electrofisiológicos mediante estimulación gustativa y evocación de señales de la lengua a la corteza gustativa, se ha descrito que los estímulos gustativos están confinados al área agranular de la corteza insular (Travers, 1993).

La codificación del trazo de memoria al sabor inicia con la transducción química de un nuevo sabor en la cavidad oral, haciendo contacto con las células gustativas. En la lengua, en ratones, las papilas gustativas se clasifican en tres clases: las papilas caliciformes, que se encuentran en la parte posterior de la lengua; las papilas foliadas, que se localizan en el borde lateral posterior, y las papilas fungiformes, las cuales se distribuyen entre los dos tercios anteriores de la lengua. Las papilas gustativas en la lengua y el paladar están inervados por tres nervios aferentes: la cuerda del tímpano, petroso mayor superficial, y glossofaríngeo. Estos nervios llevan

información de los receptores gustativos al núcleo del tracto solitario (NTS), ubicado en el tronco cerebral, principalmente a través de los pares craneales: facial (VII) y glossofaríngeo (IX), y de la laringe y faringe a través del nervio vago (X par craneal). Pruebas electrofisiológicas indican que las neuronas del NTS proyectan ipsilateralmente al núcleo posteromedial parabraqueal (NPB), y mediante el uso de técnicas de inmunohistoquímica se ha demostrado que las fibras gustativas llegan a la parte dorsolateral del NPB. De esta estructura, hay proyecciones para el hipotálamo lateral, el núcleo del nicho de la estría terminalis, la amígdala central (CEA) y basolateral (BLA), y la zona parvocelular del núcleo ventral posteromedial del tálamo (VPM). Este último, proyecta hacia la corteza insular gustativa, una región localizada a lo largo del surco rhinal, dorsal a la corteza perirhinal (Yarmolinsky et al., 2009; Bermúdez-Rattoni, 2004; Figura 5). Es importante mencionar que el NTS recibe aferencias de la región hepática del nervio vago, así como del área postrema a través del torrente sanguíneo, estas vías son importantes, puesto que transmiten información relacionada con irritación por intoxicación gástrica (Lasiter, et al., 1982; Yamamoto et al., 1992). Diversos estudios sustentan la participación de la corteza insular en la codificación de memoria aversiva (como la que se forma durante el CAS) y su interacción con la amígdala. Se ha demostrado que las lesiones bilaterales, permanentes o reversibles, en la CI o en la amígdala ocasionan un deterioro en el trazo de la memoria al sabor que ha sido asociado con el malestar gástrico después del entrenamiento en el CAS (Bermúdez-Rattoni, 2004). Además, se ha observado que el incremento en la activación de la acetilcolina, a través de los receptores muscarínicos inicia una serie de eventos intracelulares principalmente en la CI y en la amígdala, que favorecen los cambios plásticos relacionados con el trazo de memoria gustativa a largo plazo (Bermúdez-Rattoni et al., 2003).

Hallazgos realizados por nuestro grupo de investigación muestran que la estimulación tetánica de la amígdala basolateral induce potenciación de largo plazo¹ (LTP por sus siglas en inglés) en la corteza insular agranular en ratas (Escobar et al., 1998a). En este mismo sentido, la infusión de inhibidores de los receptores NMDA

² LTP es el incremento prolongado de la eficiencia sináptica debido a la estimulación de las fibras aferentes a un área determinada del sistema nervioso.

en la CI deterioran la adquisición del CAS (Escobar et al., 1998b, 2002). Los reportes aquí enunciados sustentan la propuesta de que tanto la corteza insular como la amígdala son regiones interconectadas que contribuyen con el establecimiento del trazo mnémico al sabor, de crucial importancia para la supervivencia de todo organismo. La persistencia de este trazo mnémico implica todo un complejo mecanismo a nivel molecular, dentro del cual se encuentra una importante participación de las neurotrofinas.

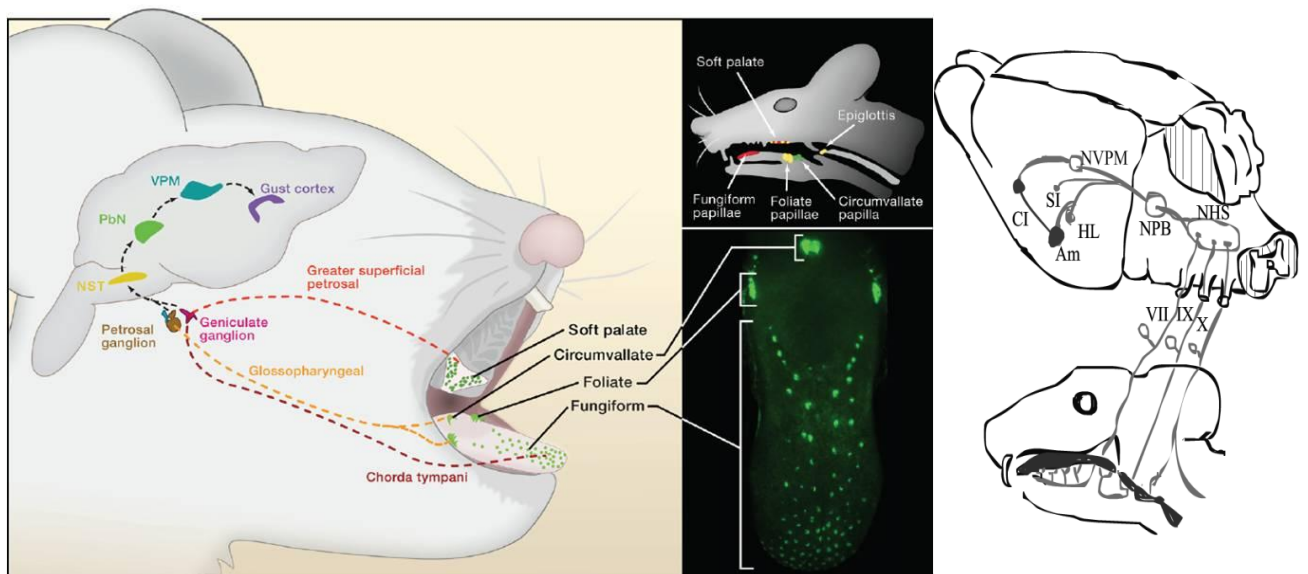


Figura 5. Anatomía del sabor, vía gustativa de la rata. En la figura de la izquierda se observa la distribución de las tres clases de papilas gustativas, señaladas también en el panel inferior derecho en la imagen de fluorescencia. Las células del sabor en la lengua y el paladar son inervadas por tres nervios: la cuerda del tímpano (chorda tympani), petroso mayor superficial (grater superficial petrosal), y glossofaríngeo (glossopharyngeal), en donde la información gustativa es conducida hasta su relevo final en la CI o gustativa (gust cortex). Abreviaturas: NST, núcleo del tracto solitario; PbN, núcleo parabraquial; VPM, núcleo ventroposteromedial del tálamo. En la figura derecha se muestra un esquema de las vías gustativas aferentes en la rata. Abreviaturas: VII, nervio facial; IX, nervio glossofaríngeo; X, nervio vago; NHS, núcleo ventroposteromedial del tálamo; CI, corteza insular; SI, sustancia innominada; HL, hipotálamo lateral; Am, amígdala (Yarmolinsky, et al., 2009; Modificado de Bear, et al., 2001).

2.4. Neurotrofinas

Los procesos tales como la diferenciación, proliferación, crecimiento y sobrevivencia neuronal (los cuales favorecen la diversidad celular), así como la sinaptogénesis y las formas de plasticidad sináptica dependientes de actividad, son producto de la acción de diversos factores, entre los cuales se encuentran ciertas

moléculas denominadas neurotrofinas. Además, la mayor parte de los también denominados factores neurotróficos estimulan el crecimiento y guía hacia los blancos de las fibras nerviosas en regeneración (Lewin y Barde, 1996; Huang y Reichardt, 2001; citados por Lu et al., 2005; Escobar, 1994; Brailowsky et al., 1997). Inicialmente, estas proteínas fueron identificadas como promotores de sobrevivencia para las neuronas sensoriales y simpáticas, y se ha demostrado que controlan varios aspectos de sobrevivencia, desarrollo, diferenciación y función tanto de neuronas del sistema nervioso central como periférico, así como la formación de la sinapsis y la plasticidad sináptica (Reichardt et al., 2006).

La primera neurotrofina caracterizada fue el factor de crecimiento nervioso (NGF, por sus siglas en inglés), y fue descubierta en una investigación para los factores de sobrevivencia que pudieran explicar los efectos perjudiciales de la supresión del tejido diana en la subsecuente sobrevivencia de neuronas sensoriales y motoras (Levi-Montalcini, 1987; citado por Reichardt, 2006). La purificación y clonación del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés) y su caracterización bioquímica que lo relacionaron con el NGF, condujo al descubrimiento de los miembros restantes de la familia de las neurotrofinas, que incluyen, además de los anteriores, a las neurotrofinas 3, 4, 5, 6 y 7. (NT-3, NT-4, NT-5, NT-6 y NT-7) (las últimas dos sólo han sido identificadas en peces) (Lessman et al., 2003). Cada una de las neurotrofinas activan uno o más de los tres miembros relacionados con la familia de las tropomiosina cinasa (Trk), los receptores a tirosina cinasas: TrkA, TrkB y TrkC. Además, cada neurotrofina activa al receptor p75 (p75NTR), miembro de la súper familia de los receptores del factor de necrosis tumoral (Poo, 2001; Reichardt et al., 2006; Figura 6).

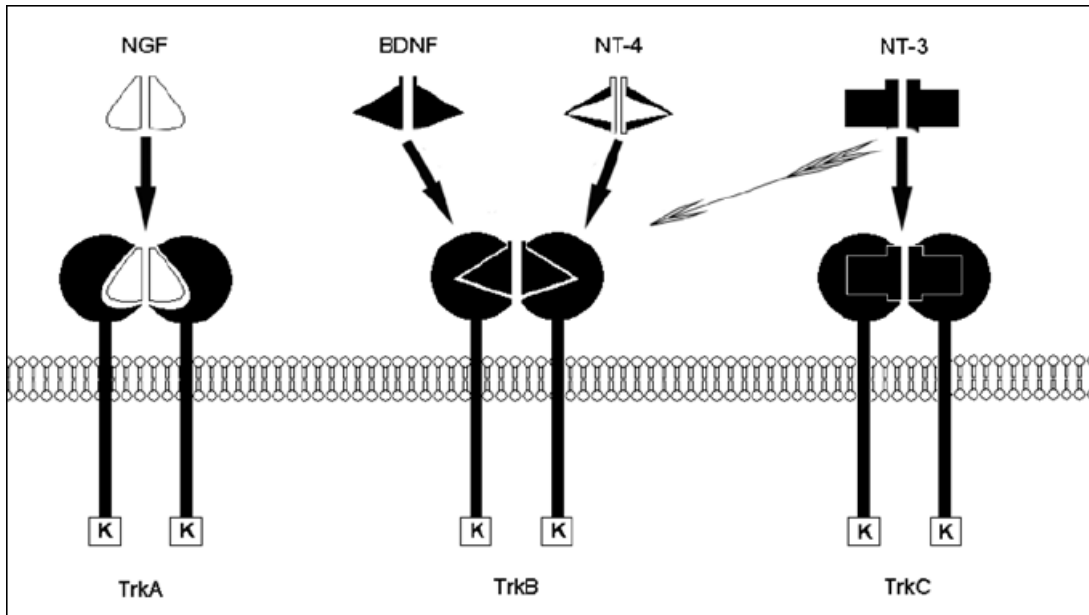


Figura 6. Neurotrofinas y activación de sus receptores específicos. Cada una de las proteínas forma un dímero que permite la activación de los receptores específicos. Así TrkA actúa como receptor del NGF; TrkB, principalmente del BDNF y de la NT-4/5; y el TrkC de la NT3. K= Porción intracelular de tirosincinasa. (Modificado de Gomez-Palacio-Schjetnan y Escobar-Rodríguez, 2007).

Las neurotrofinas (al igual que otros péptidos) son sintetizadas como proneurotrofinas (proNTs) que son precursores de las proteínas maduras, cuyo predominio es escindido en el retículo endoplásmico, que subyace a modificaciones post-transcripcionales en su vía a través del aparato de Golgi y en su acumulación en la red trans-Golgi para finalmente ser secretadas en vesículas. El procesamiento de un precursor inicia por la escisión proteolítica por una endopeptidasa (proteínas convertasas residentes en el aparato de Golgi) seguido por la remoción de la terminal carboxilo y/o amino por una exoproteasa (carboxipeptidasa o aminopeptidasa). Alternativamente, las proNTs son liberadas y pueden ser escindidas extracelularmente por la cascada de plasmina y por metaloproteinasas (Leßmann y Brigadski, 2009). Seguido de su síntesis, las neurotrofinas y sus receptores son transportados en vesículas a las dendritas postsinápticas o a las terminales presinápticas. Se ha demostrado que su transcripción y empaquetamiento en vesículas también puede ocurrir localmente en las dendritas (Kang y Schuman, 1996). Evidencias recientes indican que las neurotrofinas también pueden actuar

como moduladores sinápticos. La secreción de las neurotrofinas puede modular la liberación presináptica del neurotransmisor y la respuesta postsináptica de los receptores después de la formación del complejo: Neurotrofina- receptor Trk (Poo, 2001; Figura 7).

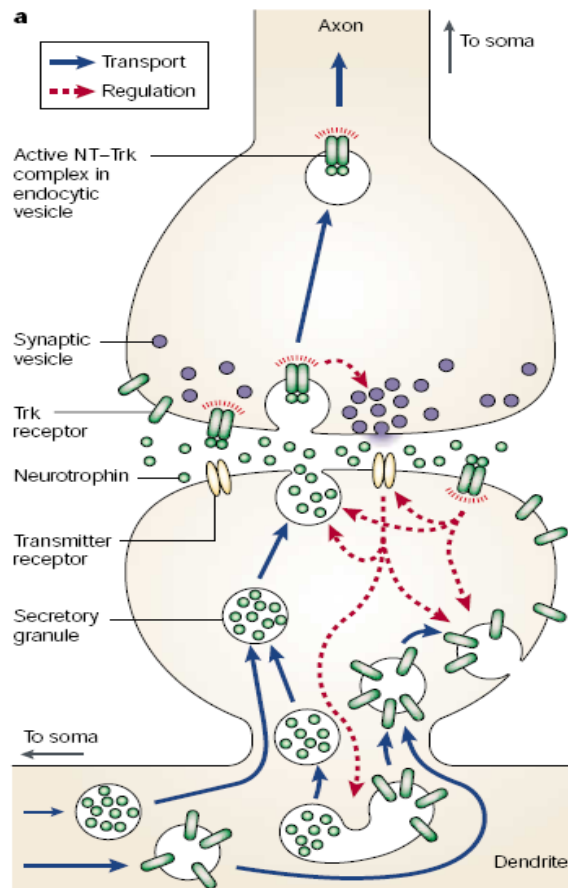


Figura 7. Transporte y secreción de las Neurotrofinas. En la figura se observa que luego de su síntesis, las NTs y sus receptores Trk son transportados en gránulos secretores y vesículas post-Golgi hacia las dendritas postsinápticas o a las terminales presinápticas. La neurotrofina secretada se liga y activa a los receptores Trk en la membrana pre o post sináptica y el complejo formado: NTs-Trk es internalizado por endocitosis (Poo, 2001).

2.5. El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)

El BDNF es una proteína dimérica cuyo peso molecular es de 27 kDa y su secreción en forma madura activa preferencialmente a los receptores TrkB, mientras que en su forma inmadura, el proBDNF, se liga al receptor p75, favoreciendo la generación de

mecanismos apoptóticos. Se ha observado una alta expresión de esta neurotrofina y de su receptor de alta afinidad, TrkB en la neocorteza, así como en distintas regiones del sistema nervioso central (SNC): corteza piriforme, complejo amigdalóide, formación hipocampal, entre otras (Yan et al., 1997). Esta neurotrofina se encuentra contenida en vesículas secretoras, como se mencionó anteriormente, presentes en los botones terminales y en las dendritas principalmente de las neuronas glutamatérgicas, y su secreción se da en forma dependiente de actividad tanto de sitios pre como postsinápticos (Hartmann et al., 2001). Se conocen dos vías por las cuales esta neurotrofina es secretada:

- 1) VÍA REGULADA. Implica exocitosis dependiente de Ca^{2+} de los gránulos secretores. El pro-BDNF brota o se sale de la red trans-Golgi en gránulos secretores inmaduros que contienen una serie distinta de convertasas. El BDNF maduro es liberado en gránulos secretores en una ruta hacia la membrana plasmática. Los gránulos se acumulan en la membrana plasmática y son eventualmente liberados sobre disparos de señalización por una secreción regulada. Esta vía permite a las neurotrofinas controlar la eficiencia sináptica de una forma rápida y específica de vías de entrada.
- 2) VÍA CONSTITUTIVA. Emplea un tipo distinto de vesículas que liberan su contenido cuando alcanzan la membrana plasmática. Las proteínas convertasas presentes en la red trans-Golgi pueden escindir la pro-secuencia y el BDNF maduro es direccionado hacia una liberación constitutiva. Esta vía produce un suministro sostenido de neurotrofinas extracelulares, regulando su concentración basal en el espacio extracelular (Leßmann y Brigadski, 2009; Figura 8).

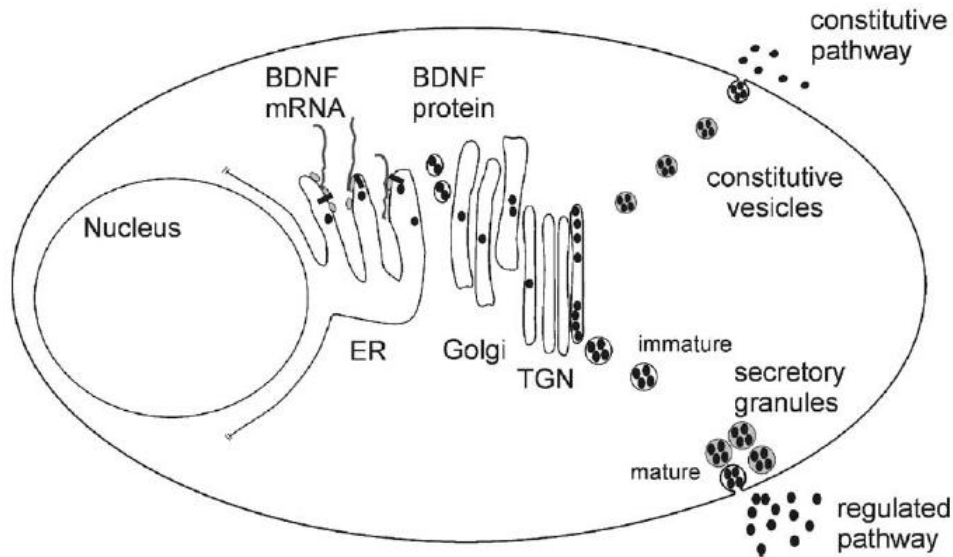


Figura 8. Ruta de síntesis y secreción del BDNF. El BDNF es transcrito por ribosomas en el retículo endoplásmico rugoso y la naciente pre-pro-neurotrofina es secuestrada en el retículo endoplásmico (ER). El BDNF es direccionado al aparato de Golgi y subsecuentemente a la red trans-Golgi (TGN). Las proteínas convertasas residentes en la TGN pueden escindir la pro-secuencia y el BDNF maduro es liberado por la vía constitutiva. Alternativamente, el BDNF sale de la TGN en forma inmadura dentro de las vesículas conteniendo una diferente serie de proteínas convertasas. Luego de su escisión, el BDNF maduro es empaquetado en vesículas hacia la membrana plasmática en donde son acumuladas y liberadas en respuesta a vías de entrada por la vía regulada (Lessman et al., 2003).

Dentro de los posibles mecanismos que favorecen la secreción de BDNF en forma regulada se encuentran: la activación de los canales de Calcio (Ca^{2+} tipo N y la movilización de Ca^{2+} de sus almacenes internos (Balkowiec y Katz, 2002; citados por Lu et al., 2008). De esta forma, el BDNF puede ejercer sus efectos tanto pre como postsinápticamente. Presinápticamente, regula la liberación de glutamato, mientras que postsinápticamente, produce modificaciones y síntesis de receptores a este neurotransmisor, expresión génica y alteraciones locales en la síntesis de proteínas (Carvalho et al., 2007). De hecho, una de las explicaciones por las cuales el BDNF actúa específicamente en las sinapsis activas, es debido a su síntesis local de BDNF y de su receptor de alta afinidad en las dendritas (Righi et al., 2000).

Respecto a la expresión génica del BDNF, han sido identificados una multitud de estímulos que la alteran, tanto en estados fisiológicos como patológicos. De esta forma, se reporta que la estimulación luminosa incrementa la expresión de ARNm para BDNF en la corteza visual, la estimulación osmótica produce el mismo efecto

en el hipotálamo, así como la estimulación de los bigotes en el área de barriles lo ocasiona en la corteza somatosensorial de las ratas (Castrén et al., 1992; 1995; Días et al., 2003; Rocamora et al., 1996; citados por Binder y Scharfman, 2004). En ciertas condiciones como el polimorfismo de BDNF Val66Met o ciertos estados patológicos, como la corea de Huntington, la ansiedad, y la depresión, diversas líneas de investigación sostienen que se compromete a la plasticidad sináptica, ocasionan asimismo un déficit en la acción del BDNF; sugiriendo con ello que la regulación de la vía de activación de este factor neurotrófico tiene gran relevancia terapéutica (Carvalho et al., 2007). Además, recientemente se ha relacionado la deficiente expresión de esta neurotrofina con la enfermedad de Alzheimer. Con relación a lo anterior, Matrone y colaboradores (2008) demostraron que la interrupción de la señalización tanto del BDNF como del NGF en neuronas hipocámpales activa la vía amiloidogénica ocasionando muerte neuronal.

Hasta el momento se han descrito varias características que postulan al BDNF como una de las proteínas sustanciales implicadas en la plasticidad sináptica: su forma de secreción dependiente de la actividad, las regiones del SNC en las cuales tanto la neurotrofina como su receptor TrkB se encuentra altamente concentrado (como la formación hipocámpal), su regulación tanto pre como post-sináptica que favorecer las modificaciones sinápticas, etc., sugieren que esta neurotrofina juega un papel muy importante dentro de los mecanismos plásticos. Una característica destacada del BDNF que lo implica en el mantenimiento de la memoria, es su capacidad moduladora en forma bidireccional de la transmisión sináptica excitatoria y de la plasticidad (Carvalho, et al., 2007), aspecto que se abordará con más detalle en el siguiente apartado.

2.6. BDNF y memoria

El establecimiento de la memoria en el largo plazo compete modificaciones tanto estructurales, moleculares, así como en las propiedades eléctricas de la neurona, las

cuales sustentan su persistencia. De esta forma, la actividad sináptica producida, ya sea debido la inducción de LTP, o bien, mediante la formación de la memoria en la resolución de un paradigma de aprendizaje, regula, entre otros fenómenos, la síntesis, secreción y acción de las neurotrofinas. Asimismo, las neurotrofinas pueden modular la morfología sináptica de una forma dependiente de actividad, favoreciendo la formación de nuevos contactos sinápticos, una acción crítica para el desarrollo de L-LTP (LTP de Largo Plazo) y la formación de la memoria de largo plazo (Poo, 2001).

Dentro de las principales neurotrofinas, cuya señalización contribuye con los cambios plásticos que acompañan a la consolidación de la memoria y a su permanencia, encontramos al BDNF. Existe evidencia sustancial la cual señala que el BDNF tiene un rol importante en la expresión de la LTP en el hipocampo, tanto en sus fases temprana (E-LTP) como tardía (L-LTP). Se ha demostrado que el BDNF regula la E-LTP a través de la liberación del BDNF presináptico existente y la subsecuente modificación de proteínas pre y postsinápticas existentes a través del receptor TrkB (Gärtner et al., 2006). Mientras que la L-LTP requiere de la síntesis y liberación del proBDNF, la conversión extracelular del proBDNF a BDNF maduro (Pang et al., 2004; Gómez-Palacio Schjetnan y Escobar-Rodríguez, 2007), y la subsecuente estimulación de síntesis proteica *de novo* mediada por BDNF, cruciales para el mantenimiento de la LTP (Yin et al., 2002).

Se ha demostrado que la liberación de BDNF en forma madura favorece la liberación de glutamato, afectando además la actividad de los receptores a dicho neurotransmisor a través de la fosforilación de sus subunidades (Carvalho et al., 2007). Asimismo, una gran diversidad de estudios demuestra que esta neurotrofina juega un rol esencial para mantener el trazo mnémico. Por ejemplo, se ha encontrado que la estimulación eléctrica que induce potenciación de largo plazo en el hipocampo incrementa la expresión de BDNF y NGF (Patterson et al., 1992; Castrén et al., 1993; Bramham et al., 1996; citados por Binder y Scharfman, 2004), y la activación de las sinapsis glutamatérgicas a partir de la estimulación con alta

frecuencia, disparan la liberación de BDNF (Hartmann et al., 2001), principalmente en su forma madura, además de favorecer la secreción de tPA³ (Nagappan, 2009).

Los tratamientos farmacológicos o genéticos que impiden que el BDNF lleve a cabo sus acciones, como la generación de ratones knockout a BDNF (Linnarsson et al., 1997), ocasionan un deterioro en la memoria espacial. De igual forma, Heldt y colaboradores en el 2007 reportaron que el decremento en la expresión de ARNm para BDNF ocasiona un deterioro tanto en la memoria de reconocimiento de objetos, como en la extinción del condicionamiento al miedo. En un par de estudios llevados a cabo por nuestro grupo de investigación, se reporta que la infusión intrahipocampal aguda de BDNF produce un incremento en la eficacia sináptica en la proyección del giro dentado al área CA3 del hipocampo, ocasionando asimismo cambios morfológicos a nivel presináptico en la vía de las fibras musgosas (Gómez-Palacio-Schjetnan y Escobar, 2008). De igual manera, la microinfusión intracortical de esta neurotrofina induce LTP en la proyección de la amígdala basolateral a la corteza insular, una región, que como hemos descrito, se encuentra ampliamente implicada en el almacenamiento y adquisición de diferentes tareas aversivas (Escobar et al., 2003). En este mismo orden de ideas, la microinfusión intracortical de BDNF aumenta la retención del condicionamiento aversivo a los sabores (Castillo et al., 2006). Recientemente, un estudio publicado por nuestro grupo de investigación reveló que la microinfusión de BDNF previa a la sesión de adquisición del condicionamiento aversivo a los sabores revierte el déficit sobre la consolidación de la memoria aversiva al sabor ocasionado por la inhibición de síntesis de proteínas en la corteza insular; revelando con ello que la presencia de esta neurotrofina es fundamental para la estabilización de la memoria en áreas neocorticales como la corteza insular (Moguel-González et al., 2008). Resultados similares se obtuvieron al administrar el BDNF en el hipocampo y evaluar el efecto en el paradigma de evitación inhibitoria (Bekinschtein et al., 2008). Estudios como el de Bekinschtein y colaboradores (2007), señalan que 12 horas después de la adquisición de una tarea aversiva se presenta una fase dependiente de síntesis de proteínas y de BDNF en el hipocampo, crítica para la persistencia de la memoria de

³ tPA. Plasminógeno activador del tejido (por sus siglas en inglés), es un tipo de proteína convertasa implicada en la ruptura o escisión del pro-dominio del BDNF para convertirlo a su forma madura. Como una enzima, cataliza la conversión del plasminógeno a plasmina, la mayor enzima responsable de la escisión.

largo plazo. Ahora bien, es plausible que esta ventana relacionada a las 12 horas luego de la adquisición sea sólo el primero de una serie de eventos que tiene lugar en áreas hipocampales y extra hipocampales (como en la neocorteza), necesarios para la persistencia de la información almacenada (Medina et al., 2008).

Los estudios antes reportados señalan que el BDNF, debido a que contribuye en la formación y estabilización de la sinapsis, ejerce asimismo efectos favorables en cuanto al mantenimiento de la información. Esto gracias a las cascadas de señalización que desencadena al acoplarse a su receptor de alta afinidad. En el siguiente apartado, se profundiza acerca de estas vías de señalización requeridas para la plasticidad sináptica, subsecuente a la liberación de BDNF.

2.7. Vías de señalización del BDNF

Los cambios estructurales en las espinas sinápticas, así como en la actividad eléctrica de la neurona y la formación de nuevos contactos sinápticos, contribuyen a la modulación de la transmisión sináptica que ocurre después del aprendizaje o de la LTP. Como ya se ha indicado, el BDNF es una neurotrofina capaz de mantener la información adquirida, debido a sus efectos moduladores de la plasticidad en regiones pre y postsinápticas. Las razones de su eficacia reguladora son plausibles una vez que analizamos sus vías de señalización.

Como ya lo mencionamos, el BDNF en su forma madura activa a sus receptores de alta afinidad, los TrkB, que pertenecen a la subfamilia de los receptores de tirosina cinasa (Trk). El dominio extracelular de cada uno de estos receptores consiste de un grupo copioso de cisteína, seguido por tres leucinas, otro grupo de cisteína y dos dominios de inmunoglobulina. Cada grupo atraviesa la membrana una vez y termina con un dominio citoplasmático que consiste de un dominio de tirosina cinasa rodeado por varias tirosinas que sirven como sitios de acoplamiento dependientes de fosforilación para enzimas y adaptadores citoplasmáticos. El BDNF, como el resto

de las neurotrofinas actúa en dímero para acoplarse a los receptores TrkB, favoreciendo su activación a través de la transfosforilación de las cinasas presentes en su dominio citoplasmático (Reichardt, 2006). Existen isoformas de los receptores Trk denominados receptores truncados, los cuales carecen de los residuos de tirosina cinasa. Estos receptores son capaces de unirse con sus correspondientes ligandos, pero incapaces de iniciar los eventos de fosforilación requeridos para la transducción de señales. Así la distribución y concentración en la membrana de dichos receptores truncados podría modular la actividad de las neurotrofinas restringiendo su disponibilidad para interactuar con los receptores completos (Rose et al., 2003; citado por Gómez-Palacio Schjetnan y Escobar-Rodríguez, 2007).

Una vez que el BDNF se ha acoplado a su receptor completo TrkB, tiene lugar la autofosforilación y el acoplamiento de la proteína SH2 a un residuo de tirosina intracelular. Este evento favorece la formación del complejo Grb2/SOS, el cual activa a su vez a la proteína G-ras, iniciando la fosforilación de MAPK, como MEK y ERK (cinasas reguladas por señalización extracelular), a través de las proteínas cinasas raf. Este mecanismo conlleva a la fosforilación de cinasas como la ribosomal S6 (RSK) o la cinasa activada por mitógeno y estrés (MSK1). La activación de esta vía de señalización conduce a la síntesis de nuevas proteínas por medio de la fosforilación de factores de transcripción como CREB (elemento de unión responsivo al AMPc) y de factores de iniciación como el eIF4E, relacionados con la formación de nuevos contactos sinápticos. Otra vía que suele desencadenar la señalización de este receptor (TrkB) es la de la PLC (fosfolipasa C). Una vez que se inicia la autofosforilación, se produce la activación de la PLC, la cual a su vez produce la activación de segundos mensajeros como el IP3 (inositol trifosfato) y el DAG (diacil glicerol). La activación de IP3 incrementa los niveles intracelulares de calcio, mientras que la activación de DAG conlleva a la activación de proteínas cinasas como PKC y PKA (proteína cinasa C y A, respectivamente) (Xing, et al., 1996; Gómez-Palacio Schjetnan y Escobar-Rodríguez, 2007; Figura 9).

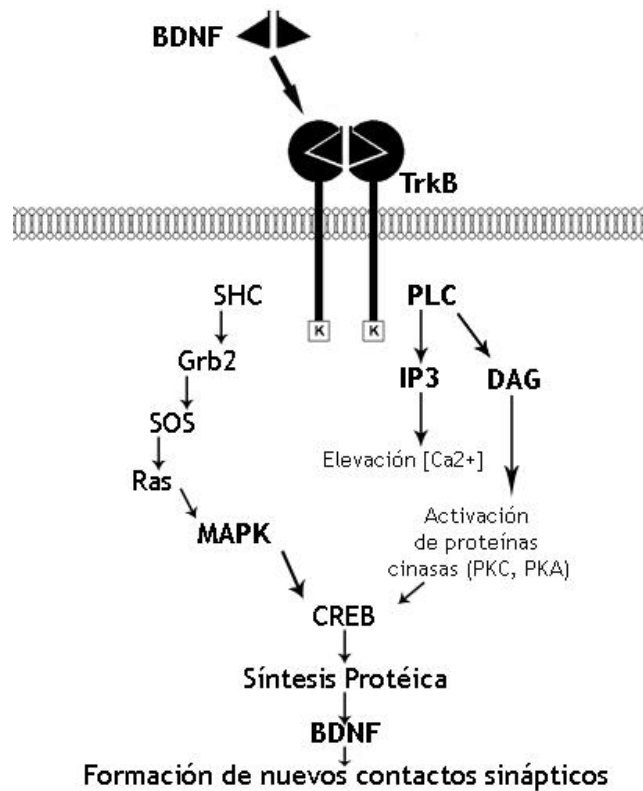


Figura 9. Vía de señalización del BDNF. En la imagen se observan dos de las rutas de señalización que desencadena el BDNF una vez que se une a sus receptores TrkB, dando como producto final la síntesis de nuevas proteínas y la formación de nuevos contactos sinápticos (Gómez-Palacio Schjetnan).

Recientemente el desarrollo de trabajos como el de An y colaboradores en 2008 han contribuido a la generación de un modelo en donde se señala la inducción de la plasticidad sináptica a partir del BDNF, por medio de la activación de los receptores TrkB y el mecanismo por el cual el BDNF sintetizado dendríticamente regula la morfología de la espina dendrítica. En el modelo (Figura 10) se observa que en un estado no estimulado, la espina dendrítica se mantiene silente; los ARNm son reprimidos transcripcionalmente por gránulos represores, los receptores α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-receptor de ácido isoxazolepropionico (rAMPA⁴) y TrkB se conservan intracelularmente, y la dinámica de actina deja a la cabeza de la espina en estado inmaduro. En contraparte, luego de la estimulación sináptica, los ARNm son desreprimidos, el TrkB se inserta en la membrana, el proBDNF y tPA son empaquetados juntos o separados y liberados en la hendidura sináptica. De esta forma, el proBDNF es convertido a BDNF en su forma madura por la plasmina,

⁴AMPA. Receptor ionotrópico glutamatérgico que controla un canal de sodio. Cuando está abierto produce potenciales excitatorios post sinápticos.

ligándose al receptor TrkB en la membrana dendrítica. La activación del receptor TrkB y BDNF incrementa la transcripción de CaMKII (Calcio Calmodulín Cinasa tipo II), GluR1⁵, Arc⁶ y Limk1⁷, favoreciendo el incremento de la formación y de la inserción en la membrana de los receptores AMPA y la polimerización de actina. La señalización de TrkB también favorece la fosforilación de los NMDA, sinapsina 1 y cofilina; esto incrementa la actividad del receptor, la fusión de la vesícula en la membrana plasmática, la liberación del neurotransmisor y la polimerización de actina respectivamente (An et al., 2008; citado por Waterhouse y Xu, 2009).

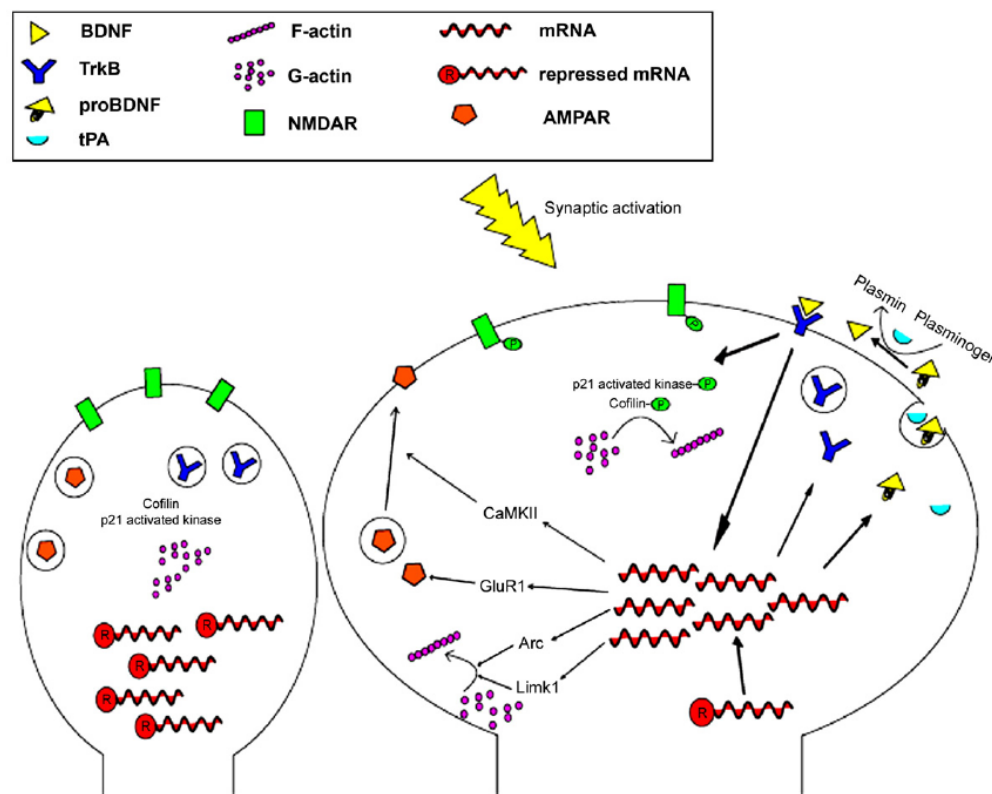


Figura 10. Mecanismos de plasticidad sináptica inducidos por BDNF. Modelo en donde se indica la inducción de la plasticidad sináptica por el BDNF a través de la activación de los TrkB y el mecanismo por el cual el BDNF sintetizado dendriticamente regula la morfología de la espina dendrítica (Waterhouse y Xu, 2009).

Recientes estudios han implicado a la cascada de ERK en la plasticidad neuronal y en la memoria de largo plazo. Como se indicó, esta cascada converge finalmente en una ruta que desencadena muchas vías de señalización como AMPc/PKA y PKC, para activar CREB y otros factores de transcripción, así como la inducción de genes

⁵ GluR1. Una de las cuatro subunidades por las cuales se encuentra compuesto el receptor AMPA.

⁶ Arc. Proteína asociada al citoesqueleto regulada por la actividad.

⁷ Limk1. Cinasa del dominio LIM1. Controla la dinámica de actina y la morfología de las espinas dendríticas a través de la regulación de cofilina.

de expresión temprana (IEGs, por sus siglas en inglés), involucrados en la regulación de síntesis de nuevas proteínas, necesaria para la plasticidad sináptica de largo plazo (Impey et al. 1999; Roberson et al. 1999; Vanhoutte et al. 1999; Wu et al. 2001; citados por Trifilieff, 2006). Se ha descrito que el mantenimiento de la potenciación sináptica involucra vías de señalización tales como PKA y ERK (Wang et al., 2004). En este sentido se ha demostrado que la administración de BDNF, aunado a la inducción de LTP, también ocasiona un incremento en los niveles de las proteínas MEK y ERK; mientras que la infusión de inhibidores de las MAPK ocasiona la reversión de la LTP ocasionada por la administración de BDNF (Ying et al., 2002). De igual forma, la infusión de inhibidores de esta misma vía, como el U0126, PD098059 y SL327 produce deterioros en la memoria de tipo espacial de largo plazo (Hebert y Dash, 2002), así como en el desempeño de las tareas en los paradigmas de condicionamiento de preferencia de lugar (Valjent et al., 2006) y de condicionamiento al miedo (Trifilieff et al., 2006). Aunado a lo anterior, una investigación reciente señala que el BDNF favorece la persistencia de la memoria a través de la activación de la vía de señalización de ERK (Bekinschtein et al., 2008). Con relación a esto, Alonso y colaboradores en el 2002 reportan que el bloqueo de BDNF en el área CA1 del hipocampo reduce la activación de ERK y deteriora la retención de la memoria evaluada en el paradigma de evitación inhibitoria. En contraste, la administración intrahipocampal de BDNF incrementa la activación de ERK1/2 y facilita el almacenamiento de corto plazo de la memoria aversiva (Alonso et al., 2002). En este sentido, se ha demostrado también que la fosforilación de sinapsina 1, la cual incrementa luego de la administración de BDNF, se ve reducida cuando se aplica un inhibidor de la vía de las MAPk (Jovanovic et al., 2000).

La literatura citada hasta el momento indica que el BDNF a través de las cascadas de señalización que desencadena, es clave para la promoción de cambios que subyacen al almacenamiento de la información.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estudio de los mecanismos moleculares que subyacen a los procesos de aprendizaje y memoria es de gran relevancia debido a que los cambios producidos a nivel molecular afectan a los niveles sistémico y conductual. La revisión de estos mecanismos ha sido por demás necesaria para comprender el funcionamiento completo del sistema nervioso.

Varios son los modelos y paradigmas diseñados para el estudio de las diferentes fases y tipos de memoria, siendo entre ellos el CAS el paradigma conductual preferentemente empleado para el análisis de la memoria aversiva al sabor debido a sus cualidades, puesto que esta clase de aprendizaje asociativo ocurre en un solo ensayo. Además, se tiene bien caracterizada la vía neuronal asociada a este condicionamiento (Bures, 1998; Yamamoto et al., 1994; citados por Bermúdez-Rattoni et., al., 2003). De igual forma, cabe destacar las ventajas adaptativas en términos evolutivos de este tipo de memoria, puesto que buena parte de la supervivencia de un organismo está basada en la capacidad de aprender y recordar que un alimento ingerido fue seguido de un malestar, y así predecir el potencial dañino de cualquier otro alimento que tenga atributos similares evitando su consumo. Así pues, en la presente investigación empleamos este paradigma de condicionamiento para el estudio de la memoria aversiva al sabor en el largo plazo.

En años recientes Tsien y Wittenberg desarrollaron la teoría denominada “reactivación sináptica”, que señala la existencia de ventanas temporales en las cuales es necesaria la síntesis de nuevas proteínas para mantener el trazo mnemónico por periodos prolongados (Tsien y Wittenberg, 2002). Al respecto, se encuentra en la literatura una evidencia empírica sustancial que apoya a esta teoría (Bekinschtein et al., 2007; Grecksch y Matthies, 1980; Freeman et al., 1995; Igaz et al., 2002; Romero-Granados et al., 2010). La primera parte de nuestra investigación se centró en ubicar diferentes ventanas temporales post adquisición del CAS,

susceptibles a la administración de un inhibidor de síntesis de proteínas (anisomicina), teniendo como consecuencia el deterioro en el mantenimiento de la memoria aversiva al sabor por periodos prolongados.

Como se ha observado en apartados anteriores, un importante factor neurotrófico que favorece el mantenimiento de la memoria de largo plazo es el BDNF, a través de la activación de sus receptores de alta afinidad. Además, se ha demostrado que esta neurotrofina es capaz de restaurar la fase tardía de la LTP (Pang et al., 2004), y de revertir el déficit sobre la consolidación de la memoria, ocasionado por la administración de inhibidores de síntesis de proteínas (Moguel-González et al., 2008; Bekinschtein et al., 2008). Con relación a lo anterior, estudios recientes han demostrado que 12 horas después de la adquisición se presenta una fase dependiente de BDNF para la persistencia de la memoria, en el hipocampo y en la amígdala (Bekinschtein et al., 2007; Ou et. al., 2010). Por lo anterior, la segunda parte de la presente investigación consistió en analizar los efectos que ejerce el BDNF sobre el mantenimiento de la memoria aversiva al sabor, al ser administrado dentro de las ventanas temporales lábiles al tratamiento con anisomicina.

4. OBJETIVO GENERAL

El presente trabajo tuvo por objeto identificar diferentes ventanas temporales en las cuales es necesaria la síntesis de nuevas proteínas en la corteza insular que contribuya al mantenimiento de la memoria aversiva al sabor, así como analizar la participación del BDNF durante tales procesos.

4.1. *Objetivos particulares*

El presente proyecto de investigación se dividió en dos fases experimentales. El objetivo para la primera fase fue:

- Explorar diferentes ventanas temporales específicas: 3, 5, 7 y 12 horas post adquisición del CAS con la finalidad de ubicar aquellas en las cuales se requiere de síntesis proteica *de novo* en la corteza insular para el mantenimiento de la información aversiva al sabor, para lo cual se administró anisomicina (inhibidor que bloquea la actividad de la peptidil transferasa impidiendo de esta forma la síntesis de proteínas).

Para la segunda fase, el objetivo fue:

- Analizar las ventanas temporales que resultaron susceptibles al tratamiento con anisomicina, para evaluar la participación del BDNF dentro de la corteza insular en la persistencia de la memoria aversiva al sabor.

5. HIPÓTESIS

- La síntesis proteica *de novo* es requerida en la corteza insular dentro de diferentes ventanas temporales post adquisición del CAS, por lo que la administración de anisomicina en tales periodos producirá un déficit sobre la persistencia del trazo mnémico de aversión al sabor.
- La administración intracortical de BDNF en las ventanas temporales citadas revertirá el déficit sobre la memoria aversiva al sabor ocasionado por la inhibición de síntesis de proteínas en la corteza insular.

6. METODOLOGÍA

6.1. Sujetos. Para el presente estudio se emplearon ratas macho de la cepa Wistar con pesos de entre 345-380 g., las cuales fueron mantenidas en cajas individuales de policarbonato, en un ciclo luz/oscuridad de 12/12, con comida y agua *ad libitum*, a excepción de las fases experimentales que especifiquen lo contrario.

6.2. Procedimiento experimental general.

6.2.1. Implantación de cánulas y microinfusión.

El procedimiento quirúrgico de los sujetos se llevó a cabo empleando las técnicas estereotáxicas convencionales y consistió en la implantación bilateral de cánulas guía de acero inoxidable de 1 cm de largo y .022 pulgadas de calibre, bajo el efecto del anestésico pentobarbital (Nembutal) aplicado en dosis de 50 mg/ Kg de peso corporal vía intraperitoneal.

Las coordenadas empleadas fueron: AP= +1.2 mm; ML= \pm 5.5 mm; DV= - 3 mm (Paxinos et al., 1995). El extremo de cada una de las cánulas guía fue colocado a 5 mm de la corteza insular. Ambas cánulas fueron fijadas al cráneo empleando acrílico dental de secado rápido. Un estilete de alambre de acero inoxidable fue colocado en el interior de las cánulas con la finalidad de proteger su luz de obstrucciones con material orgánico durante el periodo de entrenamiento.

Los grupos canulados fueron infundidos bilateral e intraparenquimalmente en la región correspondiente a la corteza insular. Para todos los grupos canulados, las microinyecciones fueron administradas a través de microinyectores consistentes en agujas dentales de calibre 30 ga. El micro inyector fue introducido en la cánula, previa remoción del estilete, y se extendió 5 mm por debajo del extremo inferior de

la cánula, alcanzando así la región correspondiente a la CI (el mismo procedimiento se llevó a cabo en cada uno de los hemisferios). Los microinyectores fueron conectados mediante tubos de polietileno a jeringas Hamilton con capacidad de 10 μ l. Las microinyecciones fueron dosificadas mediante una bomba de microinfusión (Carnegie Medicin, MA; Figura 9). Las soluciones y los fármacos fueron inyectados a una tasa de 1 μ l/min. Una vez inyectado el volumen total de las soluciones de acuerdo al protocolo experimental, los micro inyectores permanecieron un minuto más para asegurar la adecuada difusión de la solución en el tejido.

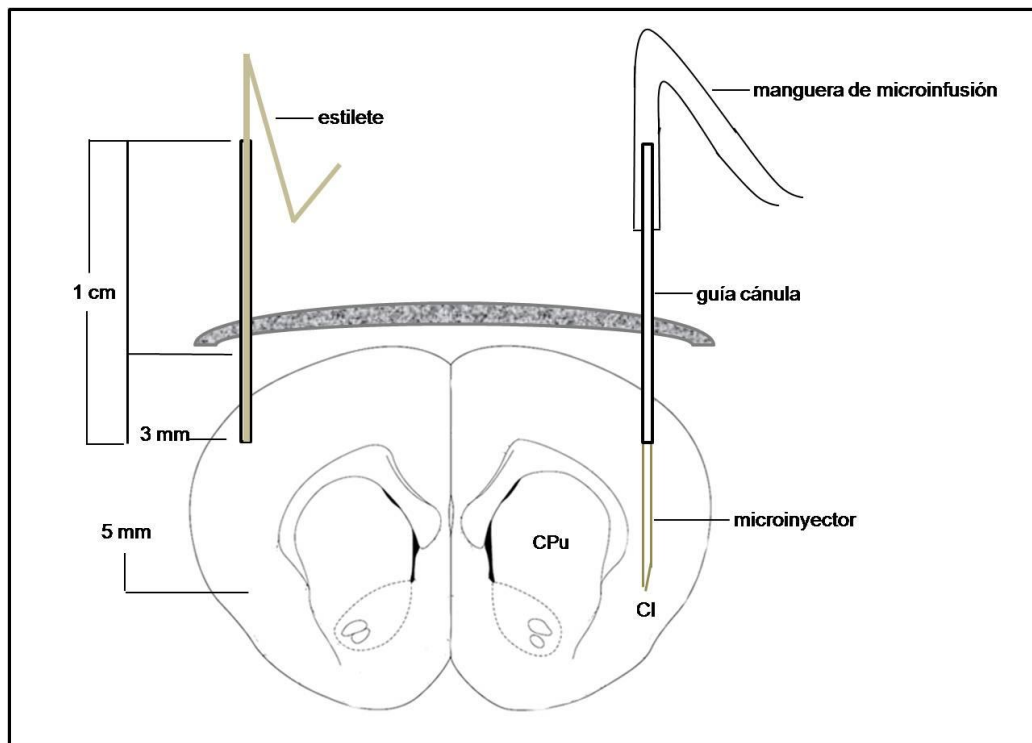


Figura 11. Esquema en un corte coronal de la posición de las guías cánula utilizadas para la infusión de los fármacos dentro de la corteza insular.
Abreviaturas: CI, corteza insular; CPU, caudado-putamen.

6.2.2. *Paradigma conductual: Condicionamiento aversivo a los sabores (CAS).*

Después de la implantación bilateral de cánulas los sujetos tuvieron un periodo post operatorio de una semana, al cabo del cual se procedió al entrenamiento del condicionamiento aversivo a los sabores (CAS). Veinticuatro horas antes del entrenamiento, los animales fueron privados de agua. Posteriormente se les entrenó a beber agua dos veces al día (10:00 y 18:00 hrs) durante 10 minutos para cada sesión de entrenamiento en un periodo de tres días durante los cuales se estableció la línea base de consumo. Los bebederos fueron contruidos con probetas graduadas cubiertas con tapones de caucho horadados con boquillas de metal. El día de la adquisición los animales fueron privados de alimento y se sustituyó el agua por un sabor novedoso (solución de sacarina al 0.1%; Sigma, WI); 10 minutos después, los animales recibieron una dosis intraperitoneal de cloruro de litio (LiCl, 0.2 M; 9.37 ml/Kg) para inducir un malestar gástrico. Después de la sesión de adquisición, se restableció el consumo de la línea base de agua durante tres días. En la prueba de aversión el agua fue sustituida nuevamente por la solución de sacarina 0.1%. La disminución del consumo de sacarina con respecto a la ingesta de agua de la línea base fue usada como parámetro comparativo de la fuerza aversiva del CAS (Figura 12).

6.2.3. *Histoquímica de Nissl.*

Una vez concluida la fase conductual de los experimentos, los animales fueron analizados histoquímicamente con el fin de observar la ubicación exacta de las cánulas. Para ello fueron sacrificados mediante una sobredosis del anestésico pentobarbital, procediendo así a la perfusión intracardial, la cual se efectuó con 400 ml de solución salina, seguido por 400 ml de solución fijadora (paraformaldehído 4%; glutaraldehído 0.2% en amortiguador de fosfato 0.1M/pH 7.4). Los cerebros fueron extraídos y almacenados para su post fijación durante 30 minutos, después

fueron transferidos a una solución de sucrosa al 30% en PBS a 0.1M (pH 7.4) en la cual se mantuvieron a 4° C durante 48 hrs. Secciones coronales de 40 µm, fueron colectadas en amortiguador de fosfato tras su obtención por microtomo de congelación (LEICA RM 2000R). Las muestras fueron teñidas con violeta de cresilo y examinadas en un microscopio de luz, con el fin de verificar la posición exacta de las cánulas.

7. DISEÑO EXPERIMENTAL.

El presente proyecto de investigación fue dividido en las siguientes fases experimentales:

7.1. Fase I.

Con el fin de localizar las ventanas temporales post adquisición en las cuales se requiere de síntesis de nuevas proteínas para mantener la información aversiva al sabor, los grupos experimentales fueron divididos de la siguiente forma:

- Grupos ANI3 (n=10), ANI5 (n=9), ANI7 (n=9) y ANI12 (n=8), los cuales recibieron una microinfusión intracortical de anisomicina (100 µg/µl; 1µl/ 1 min/ hemisferio; Rosenblum et al., 1993; Moguel-González et al., 2008) a las 3, 5, 7 y 12 hrs después de la adquisición del CAS, respectivamente (Figura 12).
- Grupo control (CON; n=5) el cual fue intervenido quirúrgicamente en ausencia de administración farmacológica y sujeto al entrenamiento del CAS.

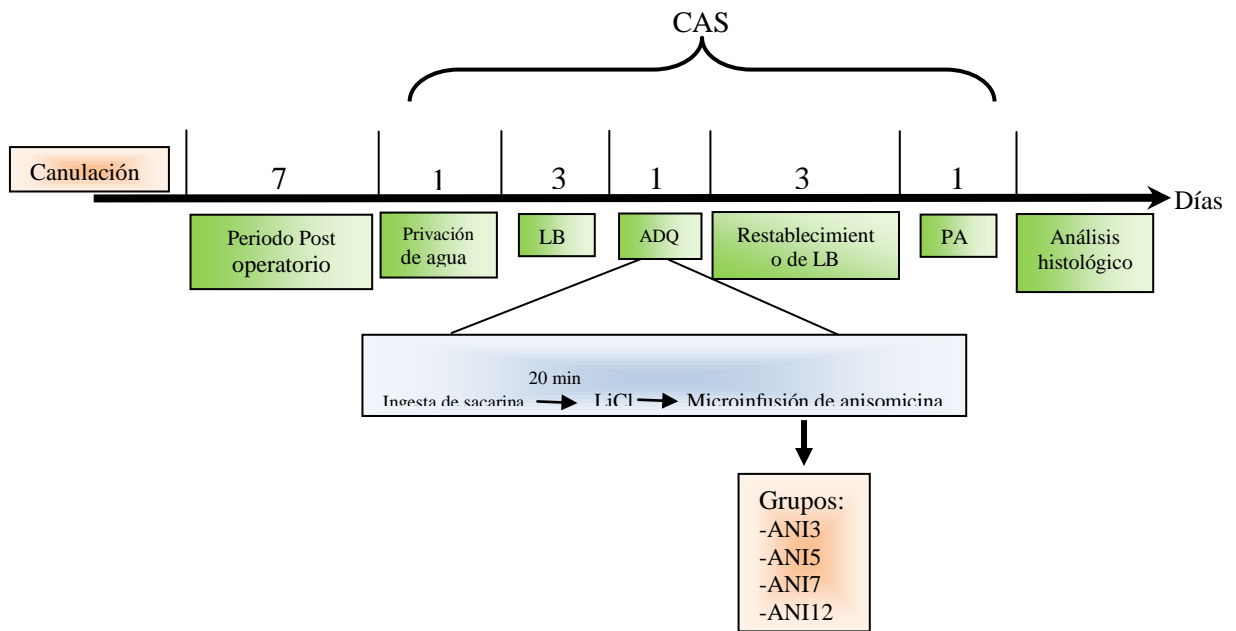


Figura 12. Diagrama de flujo correspondiente a la fase experimental I.
Abreviaturas: ADQ, adquisición; LB, línea base; PA prueba de aversión.

7.2. Fase II.

Una vez identificadas las ventanas temporales susceptibles al tratamiento con anisomicina, se evaluó la capacidad del BDNF para revertir el efecto ocasionado por la administración del inhibidor de síntesis de proteínas a las 5 y 7 hrs post adquisición del CAS. Los grupos experimentales se dividieron de la siguiente manera:

- Grupos ACSF5 (n=6) y ACSF7 (n=6), a los cuales se les administró líquido cefalorraquídeo artificial como vehículo de anisomicina (1µl; 1µl/ 1min/ hemisferio; pH 7.4) a las 5 y 7 hrs post adquisición del CAS, respectivamente.

- Grupos ANIBDNF5 (n=9) y ANIBDNF7 (n=9), a los cuales se les infundió anisomicina (100 µg/µl; 1µl / 1 min/ hemisferio) 5 y 7 horas después de la adquisición del CAS, e inmediatamente después se les administró BDNF (2µg/µl; 1 µl/ 1min / hemisferio; Escobar et al., 2003; Castillo et al., 2006).
- Grupos ANIPBS5 (n=5) y ANIPBS7 (n=5), los cuales recibieron una infusión de anisomicina (100 µg/µl; 1µl/1min/hemisferio) 5 y 7 horas post adquisición del CAS e inmediatamente después se les administró amortiguador de fosfatos empleado como vehículo durante las diluciones de BDNF (PBS; 0.1M; pH 7.4; 1 µl/1 min/hemisferio).
- Grupo control (CON; n=5) el cual fue intervenido quirúrgicamente en ausencia de administración farmacológica y sujeto al entrenamiento del CAS (Figura 13).

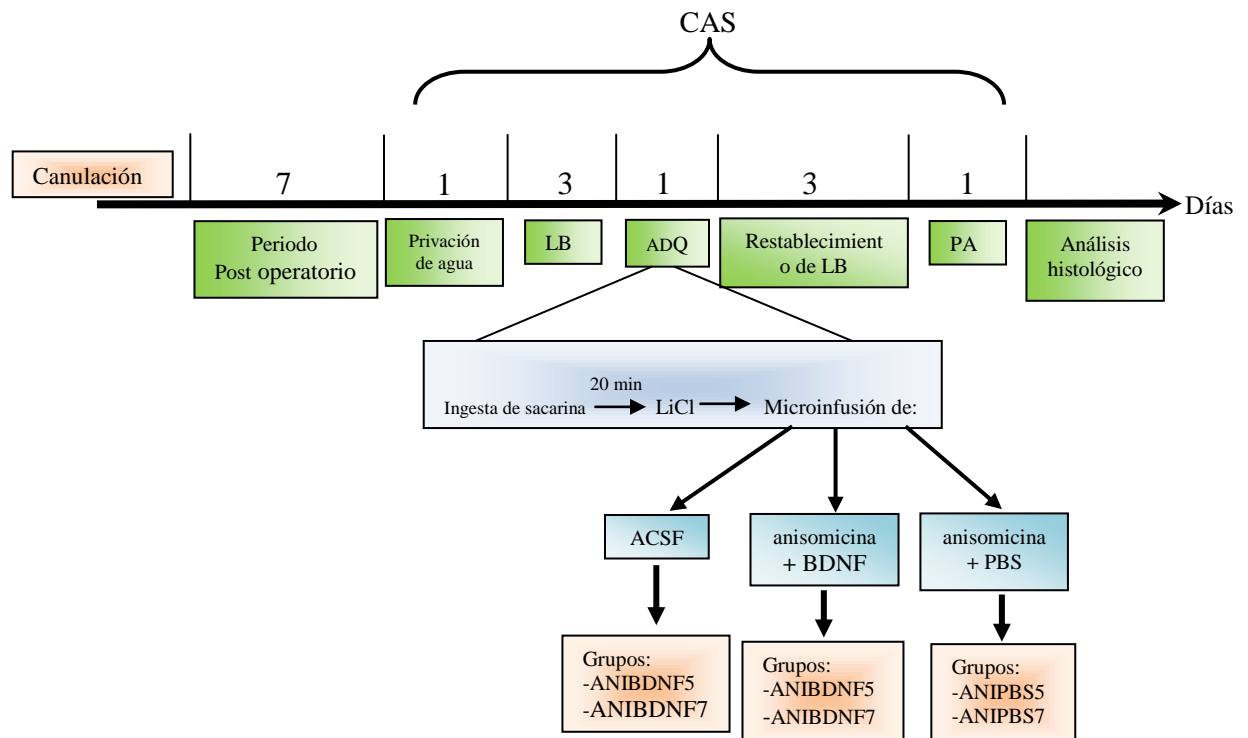


Figura 13. Diagrama de flujo correspondiente a la fase experimental II.
Abreviaturas: ADQ, adquisición; LB, línea base; PA prueba de aversión.

7.3. Análisis de resultados.

El análisis de los datos generados durante los experimentos conductuales se realizó por medio del ANOVA factorial, tomando como variables el consumo de sacarina respecto a la línea base de agua durante la adquisición o durante la prueba de aversión y el tratamiento que recibió cada grupo (tanto farmacológico como horas post administración). Posteriormente se empleó la prueba post-hoc de Fisher para ver las diferencias particulares entre cada grupo. Se tomó un nivel significativo $p < 0.01$.

8. RESULTADOS

8.1. Resultados conductuales FASE I.

No se observaron diferencias significativas entre los cinco grupos durante el consumo de la solución de sacarina en la sesión de adquisición del CAS, como se muestra en la figura 14.

Los promedios del consumo de sacarina (expresados en ml; $\bar{x} \pm E.S.$) durante la sesión de adquisición para cada uno de los grupos fueron los siguientes: 12.3 ± 0.33 ; 12.44 ± 0.33 ; 13.12 ± 0.51 ; 11.62 ± 0.46 y 14.4 ± 0.40 ; para los grupos ANI3, ANI5, ANI7, ANI12 y CON respectivamente.

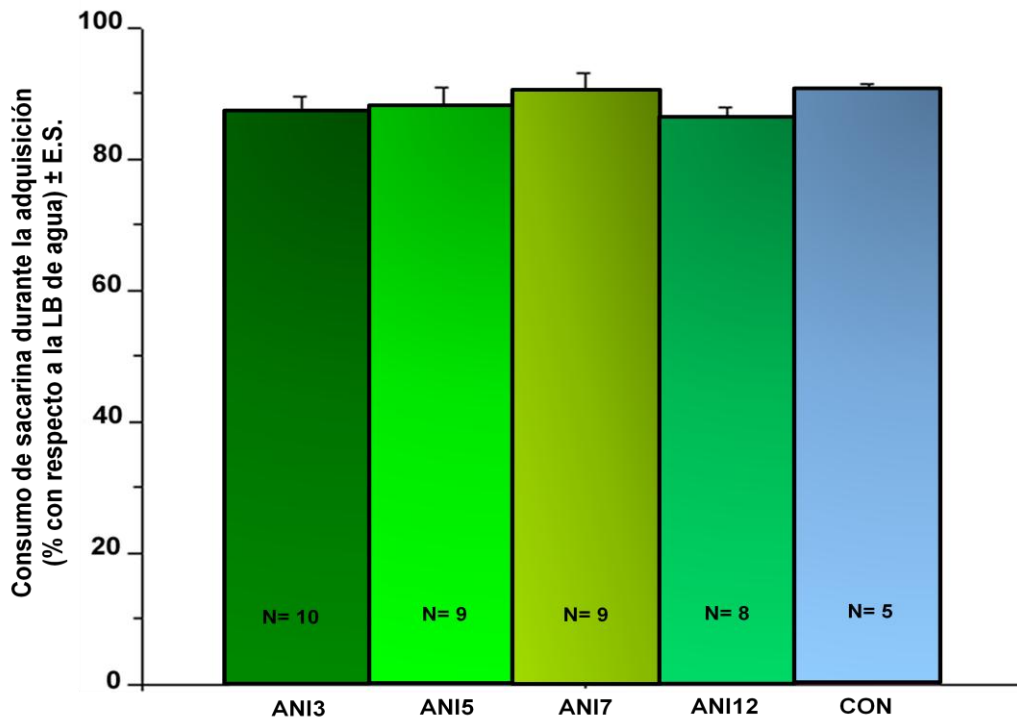


Figura 14. Consumo de sacarina durante la sesión de adquisición con respecto a la LB de agua. No se observaron diferencias significativas entre los porcentajes de consumo de sacarina durante la sesión de adquisición del CAS con relación al consumo de agua en la línea base (LB) entre los cinco grupos. Grupos: ANI3, ANI5, ANI7 y ANI12= anisomicina administrada a las 3, 5, 7 y 12 hrs post adquisición del CAS; y CON= grupo control.

Sin embargo, se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos durante la prueba de aversión (figura 15), las cuales fueron reveladas por el ANOVA factorial ($F_{(4,36)} = 29.121, p < 0.01$). La prueba *post-hoc* de Fisher mostró que los consumos de sacarina durante la prueba de aversión de los grupos ANI5 y ANI7 son diferentes significativamente respecto a los grupos ANI3, ANI12 y CON ($p < 0.001$). Estos resultados muestran que a las 5 y 7 horas después de la adquisición del CAS se requiere de síntesis de nuevas proteínas que contribuye al mantenimiento de la memoria aversiva al sabor por periodos prolongados.

Los promedios del consumo de sacarina (expresados en ml; $\bar{x} \pm E.S.$) durante la prueba de aversión de cada grupo fueron los siguientes: 3.2 ± 0.2 , 10.55 ± 0.58 , 10 ± 0.57 , 4 ± 0.53 y 3.2 ± 0.48 para los grupos ANI3, ANI5, ANI7, ANI12 y CON, respectivamente.

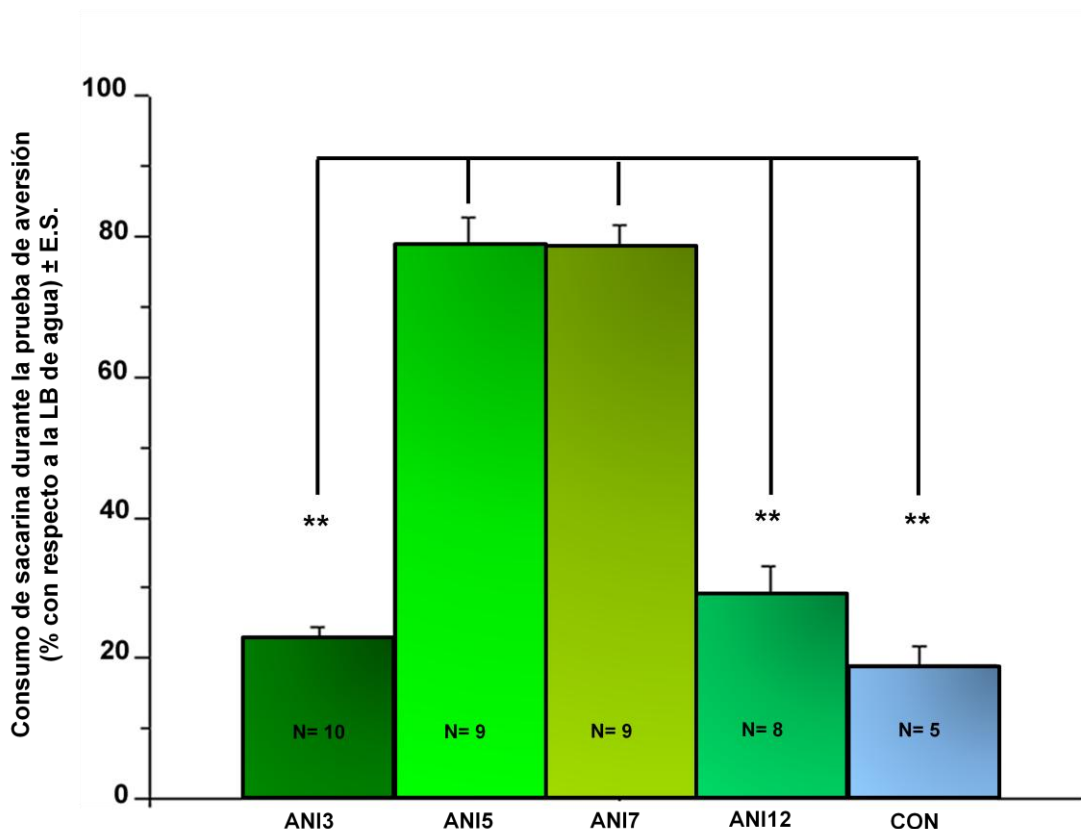


Figura 15. Requerimiento de síntesis proteica de novo a las 5 y 7 hrs post adquisición del CAS para el mantenimiento de la memoria aversiva al sabor.
Los grupos ANI5 y ANI 7 exhibieron un incremento en el consumo de sacarina durante la prueba de aversión con respecto a los grupos ANI3, ANI12 y CON, esto indica que la administración de anisomicina a las 5 y 7 hrs post adquisición produce un déficit en la memoria aversiva al sabor de largo plazo. Grupos: ANI3, ANI5, ANI7 y ANI12= anisomicina administrada a las 3, 5, 7 y 12 hrs post adquisición del CAS; y CON= grupo control. ** $p < 0.01$.

8.2. Resultados conductuales FASE II.

No se observaron diferencias significativas entre los nueve grupos durante el consumo de la solución de sacarina en la sesión de adquisición de CAS, como se muestra en la figura 16.

Los promedios del consumo de sacarina (expresados en ml; $\bar{x} \pm E.S.$) durante la sesión de adquisición para cada uno de los grupos fueron las siguientes: 12.44 ± 0.33 ; 13.12 ± 0.51 ; 14.33 ± 0.42 ; 15.16 ± 0.30 ; 11.55 ± 0.44 ; 9.88 ± 0.61 ; 13.8 ± 0.37 ; 13.8 ± 0.58 y 14.4 ± 0.40 ; para los grupos ANI5, ANI7, ACSF5, ACSF7, ANIBDNF5, ANIBDNF7, ANIPBS5, ANIPBS7 y CON, respectivamente.

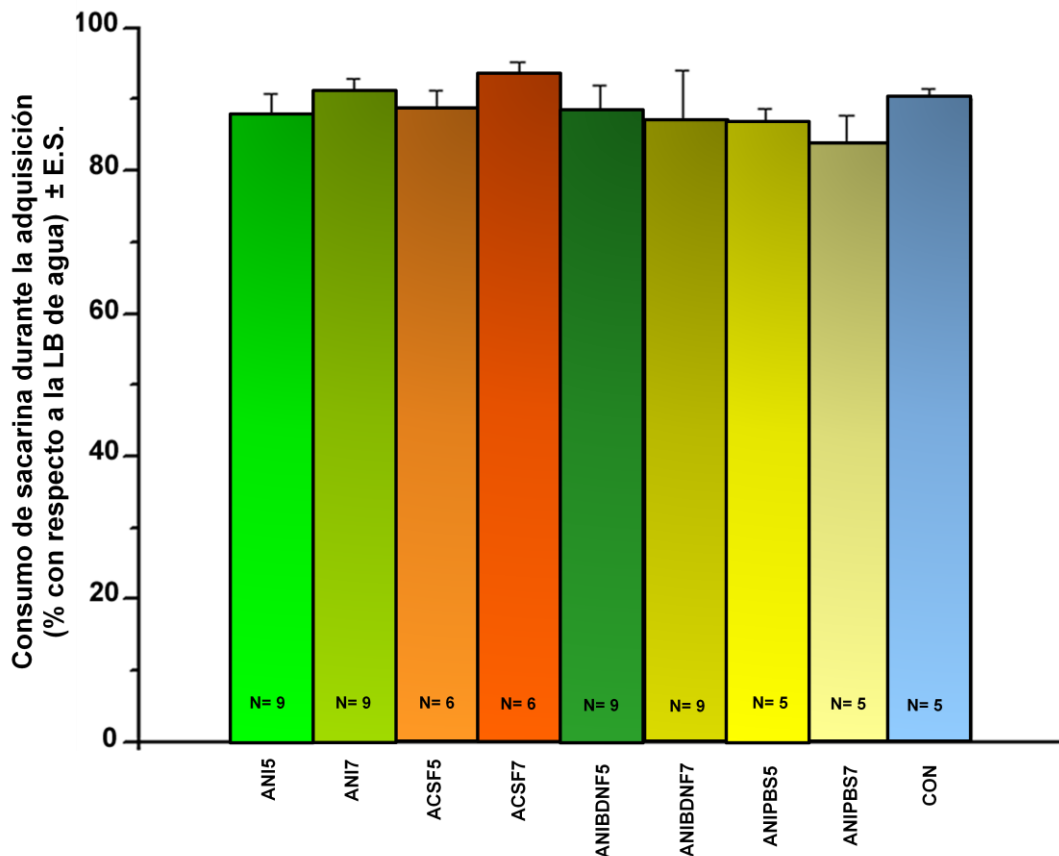


Figura 16. Consumo de sacarina durante la sesión de adquisición del CAS con respecto a la LB de agua. No se observaron diferencias significativas en el consumo de sacarina durante la sesión de adquisición del CAS con relación al consumo basal de agua (LB) entre los nueve grupos. Todos los fármacos fueron administrados después de la adquisición del CAS. Grupos: ANI5 y ANI7= anisomicina administrada a las 5 y 7 hrs; ACSF5 y ACSF7= líquido cefalorraquídeo artificial administrado a las 5 y 7 hrs; ANIBDNF5 y ANIBDNF7= anisomicina + BDNF administrados a las 5 y 7 hrs; ANIPBS5 y ANIPBS7= anisomicina + vehículo administrados a las 5 y 7 hrs; y CON= grupo

Por el contrario, se observaron diferencias significativas entre los nueve grupos durante la prueba de aversión (figura 17), las cuales fueron reveladas a través del ANOVA factorial ($F_{(8,54)} = 58.921$, $p < 0.01$). La prueba *post-hoc* de Fisher mostró que los consumos de sacarina durante la prueba de aversión de los grupos ANI5 y ANI7 en comparación a los grupos ACSF5, ACSF7 y CON fueron diferentes significativamente ($p < 0.001$). Asimismo, se observaron diferencias altamente significativas entre los grupos ANIBDNF5 y ANIBDNF7 con respecto a los grupos ANIPBS5, ANIPBS7 y CON ($p < 0.001$). Estos resultados revelan que la administración de BDNF a las 5 y 7 horas post adquisición del CAS revierte los efectos producidos por la anisomicina sobre el mantenimiento de la memoria aversiva al sabor.

Los promedios del consumo de sacarina (expresados en ml; $\bar{x} \pm E.S.$) durante la prueba de aversión para cada grupo fueron: 10.55 ± 0.58 ; 10 ± 0.57 ; 3 ± 0.25 ; 3.33 ± 0.42 ; 3.33 ± 0.55 ; 1.88 ± 0.42 ; 13 ± 0.44 ; 13.2 ± 0.58 y 3.2 ± 0.48 ; para los grupos ANI5, ANI7, ACSF5, ACSF7, ANIBDNF5, ANIBDNF7, ANIPBS5, ANIPBS7 y CON, respectivamente.

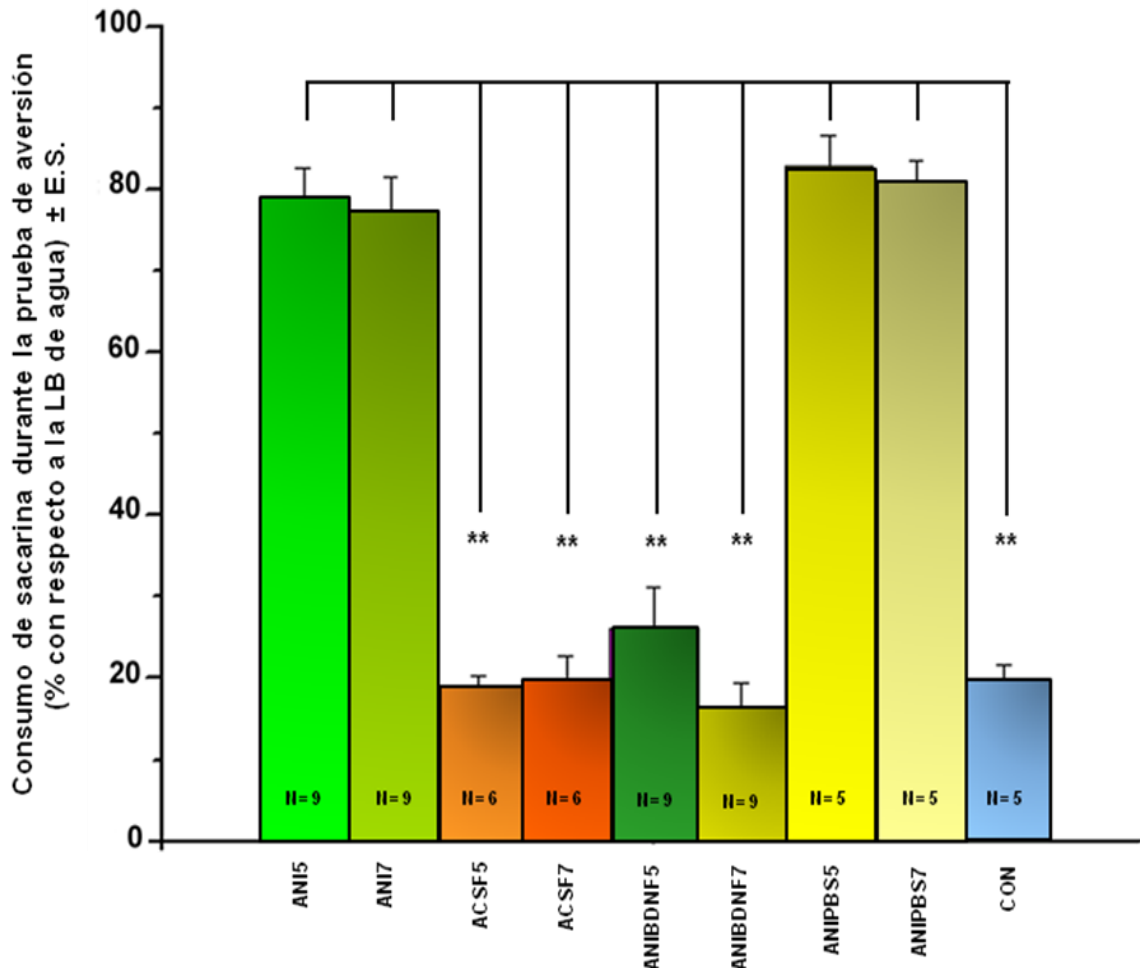


Figura 17. El BDNF revierte el efecto ocasionado por la anisomicina a las 5 y 7 hrs post adquisición del CAS. El efecto que produce la anisomicina a las 5 y 7 horas después de la adquisición es revertido por la administración de BDNF en las mismas ventanas temporales. Todos los fármacos fueron administrados después de la adquisición del CAS. Grupos: ANI5 y ANI7= anisomicina administrada a las 5 y 7 hrs; ACSF5 y ACSF7= líquido cefalorraquídeo artificial administrado a las 5 y 7 hrs; ANIBDNF5 y ANIBDNF7= anisomicina + BDNF administrados a las 5 y 7 hrs; ANIPBS5 y ANIPBS7= anisomicina + vehículo administrados a las 5 y 7 hrs; y CON= grupo control. ** p<0.01.

8.3. Resultados histológicos.

La figura 18 es una muestra representativa de la adecuada posición de los microinyectores en la corteza insular. Cabe mencionar que los animales, cuyas cánulas no presentaban una posición adecuada fueron excluidos del análisis experimental. Los análisis histológicos fueron efectuados según el procedimiento mencionado en la metodología.

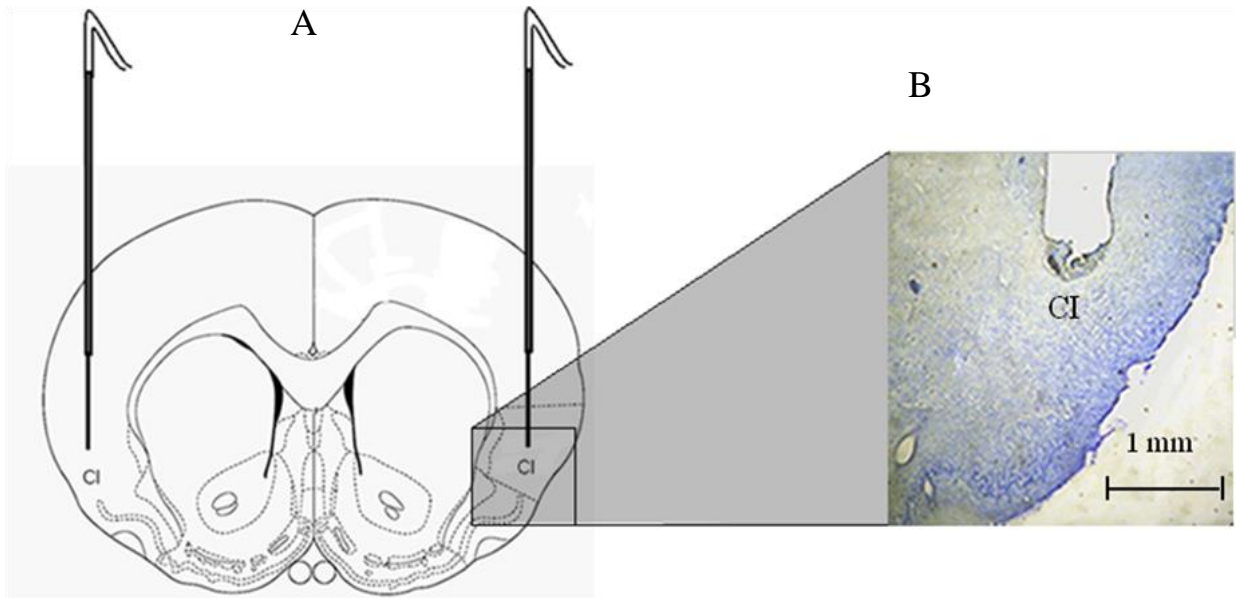


Figura 18. Ubicación de las cánulas en la CI. A. Representación esquemática de la ubicación de las cánulas en la corteza insular. B. Corte coronal representativo que muestra la ubicación de la cánula en la corteza insular, procesado con la técnica de tinción de Nissl.

9. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La capacidad de los organismos para recordar experiencias previas y de esta forma modificar su comportamiento ante las demandas del ambiente, claramente es uno de los fenómenos biológicos más importantes que favorece la supervivencia y conforma nuestra individualidad. En las últimas décadas el interés sobre los procesos que subyacen al aprendizaje y la memoria ha incrementado dramáticamente, siendo éstos parte de los fenómenos de estudio de la neurociencia cognitiva (McGaugh, 1966; Kandel y Hawkins, 1992). Gracias a ello hemos podido adentrarnos en el análisis de los mecanismos moleculares del aprendizaje y la memoria, lo cual es por demás necesario para comprender el funcionamiento del sistema nervioso tanto en su condición normal como patológica, ya que los cambios producidos a nivel molecular afectan a los niveles sistémico y conductual.

El proceso de memoria cuenta entre sus fases a la adquisición, la consolidación y la evocación (Riegler, 2005). La síntesis de nuevas proteínas es requerida durante la fase de consolidación (McGaugh, 1966; Davis y Squire, 1984; Kandel, 2001; Dudai, 2002; Barrientos et al., 2002) y recientemente se ha observado que esta síntesis proteica de novo es necesaria también en diversos periodos temporales después de la adquisición (Grecksch y Matthies, 1980; Freeman et al., 1995; Bourtchouladze et al., 1998; Tiunova et al., 1998; Igaz et al., 2002; Bekinschtein et al., 2007; Romero-Granados et al., 2010). En el presente estudio demostramos que también en regiones neocorticales como la corteza insular la síntesis proteica *de novo* se da en diferentes ventanas temporales para lograr la preservación de la memoria gustativa en el largo plazo. Una de las proteínas implicadas en la permanencia del trazo mnémico es el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés), debido a su capacidad reguladora de las modificaciones funcionales y morfológicas, esenciales para la consolidación sináptica (Carvalho et al., 2007; Bramham y Wells, 2007). Dentro de esta

investigación observamos que el BDNF tiene una importante participación en la corteza insular necesaria para el mantenimiento de la memoria aversiva al sabor.

Consolidación y “reactivación sináptica”

Diversos grupos de investigación han demostrado que durante la consolidación se requiere de síntesis proteica *de novo*, puesto que la administración de inhibidores de síntesis de proteínas como la cicloheximida, puromicina y emetina (Alberini, 2008), produce un déficit sobre el mantenimiento de la información sin afectar la adquisición (McGaugh, 1966; Davis y Squire, 1984; Kandel, 2001; Dudai, 2002; Barrientos et al., 2002). Recientemente, Tsien y Wittenberg desarrollaron una teoría denominada “reactivación sináptica”, la cual dentro de sus postulados señala la existencia de circuitos de retroalimentación proteica en ventanas temporales específicas, que favorecen el fortalecimiento del trazo mnémico y por ende, el almacenamiento de información por periodos prolongados (Tsien y Wittenberg, 2002).

En concordancia con esta teoría, el presente estudio reveló que a las 5 y 7 horas después de la adquisición del CAS se presentan dos ventanas temporales dentro de las cuales se requiere de síntesis de nuevas proteínas para que la información aversiva al sabor se mantenga por periodos prolongados. Esto se demostró a través de la administración intracortical de anisomicina, la cual bloquea la actividad de la peptidil transferasa en el ribosoma, inhibiendo de esta forma la síntesis de proteínas. Dicho inhibidor tiene un periodo de actividad de varias horas, y su pico de acción para alcanzar la inhibición del 90% de la síntesis proteica se encuentra entre los 20 y 30 minutos después de su administración (Davis y Squire, 1984; Rosenblum et al., 1993; Moguel-González et al., 2008).

Diversos grupos de investigación han cuestionado la idea sobre considerar a la consolidación como un proceso unitario, planteando que este proceso se lleva a cabo de manera reiterada a niveles tanto celular como sistémico (Grecksch y Matthies, 1980; Freeman et al., 1995; Bourtchouladze et al., 1998; Tiunova et al., 1998; Igaz et al., 2002; Bekinschtein et al., 2007; Romero-Granados et al., 2010). En este sentido, se ha demostrado que para que la memoria aversiva se mantenga en el largo plazo se requiere de la síntesis de ARNm durante dos fases temporales: la primera se presenta inmediatamente después del entrenamiento, mientras que la segunda tiene lugar entre las 3 y 6 horas después de la adquisición (Igaz et al., 2002). Asimismo, se ha observado que la administración de un inhibidor de síntesis de proteínas produce un deterioro en la memoria contextual (cuando es infundido 3 horas después de la adquisición), así como en la categorización visual (al ser administrado 5 horas después del entrenamiento; Bourtchouladze et al., 1998; Tiunova et al., 1998). En este mismo orden de ideas, Bekinschtein y colaboradores (2007) reportaron que la persistencia de la memoria aversiva requiere de una fase dependiente de síntesis de nuevas proteínas que se presenta en el hipocampo 12 hrs después del entrenamiento. Aunado a lo anterior, un estudio reciente de este mismo grupo de investigación ha revelado que el aprendizaje en el paradigma de evitación inhibitoria induce la activación de genes de expresión temprana como c-Fos y Homer 1a, y produce un incremento en los niveles de fosforilación de Akt⁸, CaMKII α ⁹ y ERK, entre las 18 y 24 horas después del entrenamiento (Bekinschtein et al., 2010).

El presente estudio, en concordancia con los trabajos citados anteriormente, revela la existencia de diferentes fases temporales en las que se requiere de síntesis de nuevas proteínas. Dichas fases tienen lugar horas después de la adquisición y son cruciales para favorecer el mantenimiento de la información. Nuestra investigación también muestra evidencia de que los mecanismos de reactivación sináptica tienen lugar en regiones neocorticales como la corteza insular.

⁸Akt. Familia de proteínas cinasas que es activada dentro de la cascada de señalización PI3k.

⁹CaMKII α . Un tipo de cadena que compone a la proteína cinasa dependiente de calcio/calmodulina II (CaMKII), requerida para la inducción de LTP en el hipocampo y para el aprendizaje espacial.

La estabilización de la memoria involucra una serie de modificaciones moleculares, morfológicas y electrofisiológicas. Dichos cambios son regulados por la acción de diferentes proteínas como el BDNF. Uno de los estudios que han evaluado la participación del BDNF en la transmisión sináptica, demostró que la LTP inducida por estimulación tetánica produce un incremento en la liberación de BDNF (Aicardi et al., 2004). En este sentido, estudios electrofisiológicos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación han revelado que la microinfusión intracortical de BDNF es suficiente para inducir LTP en la proyección de la amígdala basolateral a la corteza insular (Escobar et al., 2003). Además, la potenciación de largo plazo inducida por BDNF bloquea la inducción de LTP *in vitro* e *in vivo*, lo cual sugiere mecanismos de acción similares entre la potenciación inducida por el BDNF y la generada por la estimulación de alta frecuencia (Messaoudi et al., 2002). Por otra parte, evidencia conductual aportada por nuestro grupo de investigación muestra que la administración de BDNF modifica la curva de retención del CAS (Castillo et al., 2006). Mientras que el bloqueo farmacológico y genético del BDNF o del receptor TrkB produce un deterioro de la LTP de largo plazo (Minichiello et al., 2002).

Aunado a lo anterior, una serie de investigaciones muestran evidencia de que el BDNF es un factor esencial dentro de los mecanismos moleculares que promueven no sólo la adquisición de la información, sino también el mantenimiento del trazo mnémico. Al respecto, Pang y colaboradores demostraron que el BDNF es capaz de restaurar la fase tardía de la LTP hipocampal una vez que ha sido bloqueada por la administración de inhibidores de síntesis de proteínas (Pang et al., 2004). Asimismo, un estudio reciente de nuestro grupo de investigación demostró que la microinfusión de BDNF previa a la sesión de adquisición del condicionamiento aversivo a los sabores, revierte el déficit sobre la consolidación de la memoria aversiva al sabor ocasionado por la inhibición de síntesis de proteínas en la corteza insular; revelando con ello que la presencia de esta neurotrofina es fundamental para la estabilización de la memoria en áreas neocorticales como lo es la corteza insular (Moguel-González et al., 2008). Resultados similares se obtuvieron al

administrar el BDNF en el hipocampo y evaluar el efecto en el paradigma de evitación inhibitoria (Bekinschtein et al., 2008). De igual forma, recientes investigaciones muestran que 12 horas después de la adquisición de la memoria aversiva, se presenta una fase dependiente de BDNF tanto en el hipocampo como en la amígdala, fundamental para la persistencia de este tipo de memoria (Bekinschtein et al., 2007; Ou et. al., 2010). Nuestros resultados, en este sentido, revelan que la administración intracortical de BDNF 5 y 7 horas después de la adquisición del CAS, es capaz de revertir el déficit sobre la memoria aversiva al sabor producido por la infusión de anisomicina. Debido a lo anterior, los resultados sugieren que dentro de los mecanismos de reactivación sináptica, el BDNF es un factor crucial que coadyuva a la permanencia de la memoria en regiones neocorticales como la corteza insular.

Actualmente se considera que los cambios morfológicos dependientes de la actividad son importantes para explicar cómo los organismos almacenan información procedente de la interacción con su medio ambiente. Al respecto, extensa literatura ha demostrado que la presencia de BDNF produce efectos sobre la estructura y organización neuronal. Por ejemplo, se ha observado que el alargamiento gradual de las espinas dendríticas en las células piramidales del área CA1 del hipocampo es altamente dependiente de la síntesis de proteínas y de la acción del BDNF (Tanaka et al., 2008). Con relación a lo anterior, nuestro grupo de investigación ha reportado que la administración intrahipocampal de BDNF en el giro dentado produce un incremento en la eficiencia sináptica en la región CA3 del hipocampo y promueve cambios morfológicos a nivel presináptico (Gómez-Palacio-Schjetnan y Escobar, 2008). Los estudios anteriores muestran evidencia de que el BDNF modula los cambios sinápticos que subyacen al almacenamiento de la información.

BDNF y sus mecanismos moleculares

La participación esencial del BDNF en diversas expresiones de plasticidad sináptica ha derivado en estudios cuyo objeto ha sido identificar los mecanismos moleculares mediante los cuales el BDNF lleva a cabo sus acciones. Dentro de estos estudios se ha revelado que los efectos del BDNF en la plasticidad sináptica se relacionan ineluctablemente con la activación de su receptor de alta afinidad TrkB. Por ejemplo, Du y colaboradores (2000) demostraron que la estimulación de alta frecuencia produce la inserción de los receptores TrkB en la superficie de la membrana, fenómeno que es abatido cuando la transmisión sináptica excitadora es inhibida. Tras la interacción del BDNF con su receptor de alta afinidad, se produce la activación de tres vías de señalización principalmente: MAPK, fosfolipasa-C (PLC) y fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K). A través de estas vías, el BDNF regula la plasticidad sináptica dependiente de actividad asociada a diversos procesos como el aprendizaje y la memoria. En este sentido, un estudio reciente demostró que la aplicación exógena de BDNF en el hipocampo favorece la persistencia de la memoria a través de la activación de ERK (Bekinschtein et al., 2008). De manera similar, estudios llevados a cabo por nuestro grupo de investigación revelaron que el BDNF no incrementa la eficiencia sináptica ni modifica la retención del CAS, cuando la neurotrofina es infundida en conjunto con un inhibidor de la vía de las MAPK (Escobar et al., 2003; Castillo et al., 2006).

Las vías de señalización mencionadas previamente, conducen a la activación de diferentes proteínas cinasas como PKC, PKA y CAMK's (cinasas dependientes de calcio-calmodulina). Estas proteínas translocan al núcleo, produciendo la fosforilación de factores de transcripción como CREB y factores de iniciación, dando como resultado la síntesis de nuevas proteínas y con ello la formación de nuevos contactos sinápticos (Reichardt, 2001; Gómez-Palacio Schjetnan y Escobar-Rodríguez, 2007). Así, se ha demostrado que las acciones de las MAPK, específicamente, ERK han sido identificadas como activadoras del factor de iniciación eIF4E y el factor de elongación eEF2, los cuales están relacionados con

la traducción de proteínas, un requisito para la consolidación sináptica (Kelleher et al., 2004; Kanhema et al., 2006; Bramham y Wells, 2007).

Esta serie de evidencias demuestra que la activación de los receptores TrkB desencadena distintas rutas de señalización que interactúan entre sí durante la generación de procesos plásticos a largo plazo en el sistema nervioso.

Perspectivas

En la presente investigación se analizaron diversas fases temporales en las cuales es necesaria la síntesis de nuevas proteínas que favorece el mantenimiento de la información aversiva al sabor por periodos prolongados. Evaluando de igual forma la importancia de la presencia del BDNF para la modulación de los eventos celulares que subyacen a la estabilización y el mantenimiento de la información gustativa. Esta serie de evidencias sugiere que el BDNF es producto esencial de estas oleadas de síntesis proteica, necesario para la persistencia de la información. De manera que el conocer a fondo los mecanismos moleculares a través de los cuales el BDNF ejerce sus acciones para promover la persistencia de la memoria gustativa en la corteza insular contribuirá a inferir los mecanismos celulares por los cuales son modulados diversos procesos cognitivos.

Asimismo los resultados derivados de estas investigaciones aportarán nuevas estrategias para el tratamiento de trastornos asociados a la memoria, así como a diversas neuropatologías que comprometan la participación del BDNF.

Conclusiones:

- La síntesis de nuevas proteínas es requerida a las 5 y 7 horas después de la adquisición del CAS, lo cual es crucial para preservar la memoria aversiva al sabor en regiones neocorticales como la corteza insular. Revelando con ello que la consolidación no es un proceso unitario, sino que se lleva a cabo de manera reiterada a niveles tanto celular como sistémico.
- La infusión intracortical de BDNF a las 5 y 7 horas después de la adquisición del CAS, revierte el déficit sobre la memoria aversiva al sabor, ocasionado por la inhibición de síntesis proteica en la corteza insular.
- El BDNF es un producto esencial de las oleadas de síntesis de nuevas proteínas que se presentan horas después de la adquisición del CAS en la corteza insular.

El BDNF regula las modificaciones en las propiedades sinápticas que subyacen no sólo a la adquisición de la información, sino también que promueven la persistencia del trazo mnémico. Así, la permanencia de la memoria requiere de una reactivación constante de los mecanismos moleculares que participan durante la consolidación de la información. Parte fundamental de estos mecanismos es la presencia de BDNF.

REFERENCIAS

- Aicardi, G., Argilli, E., Cappello, S., Santi, S., Riccio, M., Thoenen, H. y Canossa, M. (2004). Induction of long-term potentiation and depression is reflected by corresponding changes in secretion of endogenous brain-derived neurotrophic factor. *PNAS*, 101 (44): 15788–15792.
- Alberini, C. M. (2008). The role of protein synthesis during the labile phase of memory: Revisiting the skepticism. *Neurobiology of Learning and Memory*, 89:234-246.
- Alonso, M., Vianna, M. R. M., Depino, A. M., Mello e Souza, T., Pereira, P., Szapiro, G., Viola, H., Pitossi, F., Izquierdo, I. y Medina, J. H. (2002). BDNF-triggered events in the rat hippocampus are required for both short- and long-term memory formation. *Hippocampus*, 12: 551-560.
- Barrietos, R. M., O'Reilly, R. C. y Rudy, J. W. (2002). Memory for context is impaired by injecting anisomycin into dorsal hippocampus following context exploration. *Behavioral Brain Research*, 134: 299-306.
- Bear, M. F., Connors, B., W., Paradiso, M. A. (2001). Neuroscience. Exploring the brain. (2 Ed.). EUA: Lippincott Williams and Wilkins.
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Katche, C., Slipczuk, L., Rossato, J. I., Goldin, A., Izquierdo, I. y Medina, J. H. (2008). BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *PNAS*, 105 (7): 2711-2716.
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Müller Igaz, L., Bevilaqua, L. R. M., Izquierdo, I. y Medina, J., H. (2007). Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis and BDNF-dependent phase in the hippocampus. *Neuron*, 53: 261-277.
- Bekinschtein, P., Katche, C., Slipczuk, L., Gonzalez, C., Dorman, G., Cammarota, M., Izquierdo, I., y Medina, J. H. (2010). Persistence of Long-Term Memory Storage: New Insights into its Molecular Signatures in the Hippocampus and Related Structures. *Neurotoxicity Research*, Artículo en prensa.
- Bermúdez-Rattoni, F. (2004). Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nature Reviews Neuroscience*, 5: 209-217.

- Bermúdez-Rattoni, F. y McGaugh, J. L. (1991). Insular cortex and amygdala lesions differentially affect acquisition of inhibitory avoidance and conditioned aversión. *Brain Research*, 549: 165-170.
- Bermúdez-Rattoni, F. y Yamamoto, T. (1998). Neuroanatomy of CTA: lesions studies. In J. Bures, F. Bermúdez-Rattoni and T. Yamamoto (Eds.), *Conditioned Taste Aversion* (pp. 27-40). USA: Oxford Science Publication.
- Bermúdez-Rattoni, F., Ramírez-Lugo, L., Gutiérrez, R. y Miranda M. I. (2003). Molecular signals into the insular cortex and amygdala during aversive gustatory memory formation. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 24 (1): 25-35.
- Binder, D. K y Scharfman H. E. (2004). Brain-derived Neurotrophic Factor. *National Institute of Health Public Access*, 22(3): 123–131.
- Bourtchouladze, R., Abel, T., Berman, N., Gordon, R., Lapidus, K., y Kandel. E. (1998). Different training procedures recruit either one or two critical periods for contextual memory consolidation, each of which requires protein synthesis and PKA. *Learning and memory*, 5: 365-374.
- Bradley, R. M. y Mistretta, C. M. (1971). Intravascular taste in rats as demonstrated by conditioned aversion to sodium saccharin. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 75 (2): 186-189.
- Brailowsky, S., Stein, D. O., Will, B. (1995). El cerebro averiado: Plasticidad cerebral y recuperación funcional. 2ª Edición. México: Fondo de Cultura Económica.
- Bramham, C. R., y Wells, D. G. (2007). Dendritic mRNA: transport, translation and function. *Nat Rev Neurosci*, 8(10): 776-789.
- Bures, J. y Buresova, O. (1989). Conditioned taste aversion elicited by intracerebral administration of drugs. *Acta Physiologica Hungarica*, 74 (1): 77-93.
- Carvalho, A. L., Caldeira M. V., Santos, S. D. y Duarte, C. B. (2007). Role of the brain-derived neurotrophic factor at glutamatergic synapses. *British Journal of Pharmacology*, 153: S310–S324
- Castillo, D. V., Figueroa-Guzman, Y. y Escobar, M. L. (2006). Brain derived neurotrophic factor enhances conditional taste aversion. *Brain Research*, 1067: 250-255.
- Craig A. D. (2009). How do you feel now? The anterior insula and human awareness. *Nature Reviews Neuroscience*, 10: 59-70.

- Davis, H. P. y Squire, L. R. (1984). Protein synthesis and memory: a review. *Psychological Bulletin*, 96: 518-559.
- Domjan, M. (1985). Cue-consequence specificity and long delay learning revisited. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 443: 57-66.
- Du, J., Feng, L., Yang, F., y Lu, B. (2000). Activity- and Ca²⁺-dependent modulation of surface expression of Brain-derived Neurotrophic Factor receptors in hippocampal neurons. *The Journal of Cell Biology*, 150 (6): 1423–1433.
- Dudai, Y. (1989). The neurobiology of memory. Concepts, findings, trends. Great Britain: Oxford University Press.
- Dudai, Y. (1996). Consolidation: Fragility on the Road to the Engram. *Neuron*, 17:367-370.
- Dudai, Y. (2002). Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. *Current Opinion in Neurobiology*, 12: 211-216.
- Dudai, Y. y Eisenberg, M. (2004). Rites of Passage of the Engram: Reconsolidation and the Lingering Consolidation Hypothesis. *Neuron*, 44: 93-100.
- Escobar, M. (1994). El factor de crecimiento neuronal en el sistema nervioso central. *Ciencia*, 45: 21-34.
- Escobar, M. L., Alcocer, I. y Bermúdez-Rattoni, F. (2002). In vivo effects of intracortical administration of NMDA and metabotropic glutamate receptors antagonists on neocortical long-term potentiation and conditioned taste aversion. *Behavioral Brain Research*, 129: 101-1106.
- Escobar, M. L., Alcocer, I. y Chao, V. (1998b). The NMDA receptor antagonist CPP impairs conditioned taste aversion and insular cortex long-term potentiation in vivo. *Brain Research*, 812: 246-251.
- Escobar, M. L., Chao, V. y Bermúdez-Rattoni, F. (1998a). In vivo long term potentiation in the insular cortex: NMDA receptor dependence. *Brain Research*, 779: 314-319.
- Escobar, M. L., Figueroa-Guzmán, Y. y Gómez-Palacio-Schjetnan, A. (2003). In vivo insular cortex LTP inuced by brain derived neurotrophic factor. *Brain Research*, 991: 274-279.
- Freeman F. M., Rose S. P. R. y Scholey, A. B. (1995). Two time windows of anisomycin-induced amnesia for passive avoidance training in the day-old chick. *Neurobiology of Learning and Memory*, 63: 291-295.

- García, J. y Koellin, Y. (1966). Relation of cue to consequence in avoiding learning. *Psychonomic Science*, 4:123-124.
- García, J., Kimeldorf, D. y Koelling, R. (1955). Conditioned Aversion to saccharine resulting from exposure to gamma radiation. *Science*, 122:157-158.
- García, J., Lasiter, P. S., Bermudez, R. y Deems, D. A. (1985). A general theory of aversion learning. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 443: 8-21.
- Gärtner, A., Polnau, D. G., Staiger, V., Sciarretta, C., Minichiello, M., Thoenen, M., Bonhoeffer, T. y Korte, M. (2006). Hippocampal Long-Term Potentiation is supported by presynaptic and postsynaptic tyrosine receptor kinase B-mediated phospholipase C γ signaling. *The Journal of Neuroscience*, 26(13):3496–3504.
- Gispen, W. H. (1993). Neuronal plasticity and function. *Clinical Neuropharmacology*, 16, S3-S11.
- Gómez-Palacio-Schjetnan, A. y Escobar, M. L. (2008). In vivo BDNF modulation of adult functional and morphological synaptic plasticity at hippocampal mossy fibers. *Neuroscience Letters*, 445: 62-67.
- Gómez-Palacio-Schjetnan, A. y Escobar-Rodríguez, M. L. (2007). Codificación y retención de la memoria: el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en la plasticidad sináptica. *Revista de Neurología*, 45 (7): 409-417.
- Grecksch, G. y Matthies, H. (1980). Two sensitive periods for the amnesic effect of anisomycin. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 12: 663-665.
- Grollman, A. P. (1967). Inhibitors of protein biosynthesis. II. Mode of action of anisomycin. *The Journal of Biological Chemistry*, 242 (13): 3226-3233.
- Hartmann, M., Heumann, R. y Lessmann, V. (2001). Synaptic Secretion of BDNF after high-frequency stimulation of glutamatergic synapses. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 20 (21): 5887- 5897.
- Hebert, A. E. y Dash, P. K. (2002). Extracellular Signal-Regulated Kinase Activity in the Entorhinal Cortex is Necessary for Long-Term Spatial Memory. *Learning and Memory*, 9: 156-166.
- Heldt, S. A., Stanek, L., Chhatwal J. P. y Ressler, K. J. (2007). Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. *National Institute of Health Public Access*, 12 (7): 657-670.
- Igaz, L. M., Vianna, M.R.M., Medina, J. H., Izquierdo, I. (2002). Two time periods of Hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear-motivated learning. *The Journal of Neuroscience*, 22 (15): 6781-6789.

- Jovanovic, J. N., Czernik, A. J., Fienberg, A. A., Greengard P. y Sihra, T. S. (2000). Synapsins as mediators of BDNF-enhanced neurotransmitter release. *Nature Neuroscience*, 3 (4): 323-329.
- Kandel, E. R. (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science*, 294: 1030-1038.
- Kandel, E. y Hawkins, R. (1992). Bases biológicas del aprendizaje y la individualidad. *Investigación y Ciencia*, 1994: 49-57.
- Kang, H., y Schuman, E. M. (1996). A requirement for local protein synthesis in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity. *Science*, 273: 1402–1406.
- Kanhema, T., Dagestad, G., Panja, D., Tiron, A., Messaoudi, E., Havik, B., et al. (2006). Dual regulation of translation initiation and peptide chain elongation during BDNF-induced LTP in vivo: evidence for compartment-specific translation control. *J Neurochem*, 99(5): 1328-1337.
- Kelleher, R. J., 3rd, Govindarajan, A., Jung, H. Y., Kang, H., y Tonegawa, S. (2004). Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory. *Cell*, 116(3): 467-479.
- Lamßrecht, R. y LeDoux, J. (2004). Structural Plasticity and Memory. *Nature Reviews of Neuroscience*, 5: 45-54.
- Lasiter, P. S., Deems, D. A., Oetting R. L. y García, J. (1985). Taste discriminations in rats lacking anterior insular gustatory neocortex. *Physiology and Behavior*, 35:277-285.
- Lasiter, P. S., Glanzman, D. L. y Mensah, P. A. (1982). Direct connectivity between pontine taste areas and gustatory neocortex in rat. *Brain Research*, 234: 111-121.
- Leonard, D. J. y Zavala, A. (1964). Electroconvulsive Shock. Retroactive Amnesia and the Single-Shock Method. *Science*, 146: 1073-1074.
- Lessman, V., Gottman, K., Malcangio, M. (2003). Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Progress in Neurobiology*, 69: 341-374.
- Leßmann, V. y Brigadski, T. (2009). Mechanisms, locations, and kinetics of synaptic BDNF secretion: An update. *Neuroscience Research*, 65 (1): 11-22.
- Linnarsson S, Bjorklund A, Ernfors P. (1997). Learning deficit in BDNF mutant mice. *European Journal of Neuroscience*, 9:2581–2587.
- Lu, B., Pang P. T., y Woo, N. H. (2005). The Ying and Yang of Neurotrophin Action. *Nature Reviews of Neuroscience*, 6: 603-614.

- Lu, Y., Christian, K. y Lu, B. (2008). BDNF: A key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory? *Neurobiology of Learning and Memory*, 89: 312-323.
- Matrone, C., Ciotti, M. T., Mercanti, D., Marolda, R. y Calissano, P. (2008). NGF and BDNF signaling control amyloidogenic route and A production in hippocampal neurons. *PNAS*, 105 (35): 13139-13144.
- McGaugh, J. L. (1966). Time-Dependent Process in Memory Storage. *Science*, 153: 1351-1358.
- McGaugh, J. L. (2000). Memory- a Century of Consolidation. *Science*, 287: 248-251.
- McGowan, B., Hankins W. G. y García, J. (1972). Limbic lesions and control of the internal and external environment. *Behavior and Biology*, 7: 841-852.
- Medina, J.H., Bekinschtein, P., Cammarota, M., Izquierdo, I. (2008). Do memories consolidate to persist or do they persist to consolidate? *Behavioural Brain Research*, 192: 61–69
- Meiri, N. y Rosenblum, K. (1998). Lateral ventricle injection of protein synthesis inhibitor anisomycin impairs long-term memory in a spatial memory task. *Brain Research*, 789:48-55.
- Messaoudi, E., Ying, S. W., Kanhema, T., Croll, S. D., y Bramham, C. R. (2002). Brain-derived neurotrophic factor triggers transcription-dependent, late phase long-term potentiation in vivo. *J Neurosci*, 22 (17): 7453-7461.
- Minichiello, L., Calella, A. M., Medina, D. L., Bonhoeffer, T., Klein, R., y Korte, M. (2002). Mechanism of TrkB-mediated hippocampal Long-Term Potentiation. *Neuron*, 36: 121–137.
- Moguel-González, M., Gómez-Palacio-Schjetnan, A. y Escobar, M. L. (2008). BDNF reverses the CTA memory deficits produced by inhibition of protein synthesis. *Neurobiology of Learning and Memory*, 90:584-587.
- Nader K., y Hardt O. (2009). A single standard for memory: the case for reconsolidation. *Nature Reviews in Neuroscience*, 10: 224-234.
- Nagappan, G., Zaitsev, E., Senatorov, V. V., Yang, J., Hempstead, B. L., y Lu, B. (2009). Control of extracellular cleavage of ProBDNF by high frequency neuronal activity. *PNAS*, 106 (4): 1267–1272.

- Ou, L., Yeh, S., y Gean, P. (2010). Late expression of brain-derived neurotrophic factor in the amygdala is required for persistence of fear memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 93 (3): 372-382.
- Pang, P. T, Teng, H., Zaitsev, E., Woo, N., Sakata, K., Zhen, S., Teng, K., Yung, W., Hempstead, B. y Lu, B. (2004). Cleavage of pro BDNF by tPA/plasmin is essential for Long-Term hippocampal plasticity. *Science*, 306: 487-491.
- Paxinos, G. & Watson, C. (1995). The rat brain in stereotaxic coordinates. Orlando: Academic Press.
- Poo, M. (2001). Neurotrophins as synaptic modulators. *Nature Reviews of Neuroscience*, 2: 24-32.
- Raven, H. V., Johnson, G. B., Losos, J. B., y Singer, R. S. (2006). Biology (7th edition), EUA, New York: McGraw-Hill.
- Reichardt, L. F. (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philosophical Transactions of the Royal Society B.*, 361: 1545-1564.
- Riegler, A. (2005). Constructive Memory. *Kybernetes*, 34:89-104.
- Righi, M., Tongiorgi, E. y Cattaneo, A. (2000). Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) induces dendritic targeting of BDNF and tyrosine kinase B mRNAs in hippocampal neurons through a Phosphatidylinositol-3 Kinase-dependent pathway. *The Journal of Neuroscience*, 20(9):3165–3174.
- Robertson, E. M, Pascual-Leone, A. y Chris Miall, R. (2004). Current concepts in procedural consolidation. *Nature Reviews Neuroscience*, 5: 1-7.
- Rodríguez-Ortiz, C. J., García- De La Torre, P., Benavidez, E., Ballesteros, M. A. y Bermudez-Rattoni, F. (2008). Intrahippocampal anisomycin infusions disrupt previously consolidated spatial memory only when memory is updated. *Neurobiology of Learning and Memory*, 89:352-359.
- Romero-Granados, R., Fontán-Lozano, A., Delgado García, J.M. y Carrión, M. A. (2010). From learning to forgetting: behavioral, circuitry, and molecular properties define the different functional states of the recognition memory trace. *Hippocampus*, 20 (5): 584-595.
- Rosenblum, K., Meiri, N. y Dudai, Y. (1993). Taste Memory: the role of protein synthesis in gustatory cortex. *Behavioral and Neural Biology*, 59: 49-56.
- Schafe, G., E. y LeDoux, J. E. (2000). Memory consolidation of auditory Pavlovian fear conditioning requires protein synthesis and Protein Kinase A in the amygdala. *The Journal of Neuroscience*, 20: 1-5.

- Singer, T., Critchley, H. D., Preuschoff, K. (2009). A common role of insula in feelings, empathy and uncertainty. *Cell Press. Trends in cognitive science*, 13 (8): 334-340.
- Tanaka, J., Horiike, Y., Matsuzaki, M., Miyazaki, T., Ellis-Davies, G. C. R., y Kasai, H. (2008). Protein Synthesis and Neurotrophin-Dependent Structural Plasticity of Single Dendritic Spines. *Science*, 319 (5870): 1683-1687.
- Tiunova, A. A., Anokhin, K. V., y Rose, S. P. (1998). Two critical periods of protein and glycoprotein synthesis in memory consolidation for visual categorization learning in chicks. *Learning and Memory*, 4: 401-410.
- Travers, S. P. (1993). Orosensory processing in neural system of the nucleus of the solitary tract. In *Mechanisms of Taste Transduction* (pp. 339-394). USA: CRC Press.
- Trifilieff, P., Herry, C., Vanhoutte, P., Caboche, J., Desmedt, A., Riedel, G., Mons, N. y Micheau, J. (2006). Foreground contextual fear memory consolidation requires two independent phases of hippocampal ERK/CREB activation. *Learning and Memory*, 13: 349-358.
- Tsien, J. Z. y Wittenberg, G. M. (2002). An emerging molecular and cellular framework for memory processing by the hippocampus. *Trends in Neuroscience*, 25 (10): 501-505.
- Valjent, E., Corbillé, A. G., Bertran-Gonzalez, J., Hervé, D. y Girault, J. A. (2006). Inhibition of ERK pathway or protein synthesis during reexposure to drugs of abuse erases previously learned place preference. *PNAS*, 103 (8): 2932-2937.
- Wang, Z. Q., Wu, D. C., Huang, F. P., Yang, G. Y. Inhibition of MEK/ERK 1/2 pathway reduces pro-inflammatory cytokine interleukin-1 expression in focal cerebral ischemia. *Brain Research*, 996 (1): 55-66.
- Wanisch, K., y Wotjak, C. T. (2008). Time course and efficiency of protein synthesis inhibition following intracerebral and systemic anisomycin treatment. *Neurobiology of Learning and Memory*, 90: 485-494.
- Waterhouse, E. G. y Xu, B. (2009). New insights into the role of brain-derived neurotrophic factor in synaptic plasticity. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 42: 81-89
- Wittenberg, G. M., Sullivan, M. R., y Tsien, J. Z. (2002). Synaptic reentry reinforcement based network model for long-term memory consolidation. *Hippocampus*, 12: 637-647.

- Xing J., Ginty, D. D., y Greenberg, M. E. (1996). Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science*, 273: 959-63.
- Yamamoto, T., Shimura, T., Sako, N., Azuma, S., Bai, W. Z. y Wakisaka, S. (1992). C-fos expression in the rat brain after intraperitoneal injection of lithium chloride. *Neuroreport*, 3:1049-1052.
- Yan, Q., Rosenfeld, R. D., Matheson, C. R., Hawkins, N., López, O. T., Bennett, L. y Welcher, A. A. (1997). Expression of brain derived neurotrophic factor protein in the adult rat central nervous system. *Neuroscience*, 78 (2): 431-448.
- Yarmolinsky, D. A., Zuker, Ch. S., Ryba, N. J. P. (2009). Common sense about taste: from mammals to insects. *Cell*, 139 (2): 234-244.
- Yin, Y., Edelman, G. M., y Vanderklish P. W. (2002). The Brain-Derived Neurotrophic Factor enhances synthesis of Arc in synaptoneuroosomes. *PNAS*, 99 (4): 2368–2373.
- Ying, S.W., Futter, M., Rosenblum, K., Webber, M. J., Hunt, S. P, Bliss, T. V, et al. (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.