



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
Instituto de Fisiología Celular

**MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA POTENCIACIÓN A  
LARGO PLAZO EN LA CORTEZA INSULAR DEBIDO AL  
ENTRENAMIENTO EN EL CONDICIONAMIENTO AVERSIVO A  
LOS SABORES: UN EFECTO METAPLÁSTICO.**

# **T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
P R E S E N T A  
LUIS FRANCISCO RODRÍGUEZ DURÁN

**JURADO DE EXAMEN DE GRADO:  
DRA. MARTHA LILIA ESCOBAR RODRÍGUEZ  
DR. ROBERTO PRADO ALCALÁ  
DR. FROYLÁN GÓMEZ-LAGUNES  
DR. FEDERICO BERMÚDEZ-RATTONI  
DR. VLADIMIR ORDUÑA TRUJILLO**

**MÉXICO, D.F.**

**2012**

**EL ESTUDIO OBJETO DE LA PRESENTE TESIS FUE REALIZADO  
GRACIAS AL APOYO DE PAPIIT (IN213210) Y CONACYT (60851)**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## RESUMEN

Hoy en día se sabe que la historia de actividad de las neuronas modula las respuestas futuras a determinados estímulos y que esta propiedad es particularmente importante en los fenómenos de aprendizaje y memoria. En este sentido, una serie de mecanismos que forman parte de la denominada plasticidad homeostática tienden a mantener la eficiencia de las conexiones sinápticas en un rango determinado, evitando de este modo los cambios abruptos que podrían ser nocivos para el funcionamiento neuronal. De este modo, la actividad sináptica promueve cambios en la habilidad para inducir plasticidad sináptica subsecuente, fenómeno que es definido como metaplasticidad. En particular, el entrenamiento en determinadas tareas conductuales modifica la habilidad para inducir cambios plásticos como la potenciación a largo plazo (LTP). Estudios previos en la corteza insular (CI) muestran que la inducción de LTP en la vía de comunicación que va del núcleo basolateral amigdalino (Bla) a la CI agranular modifica la retención del condicionamiento aversivo a los sabores (CAS), un entrenamiento conductual en el que un malestar gástrico es asociado con un sabor novedoso. El objetivo de la presente investigación es analizar la influencia del entrenamiento en el CAS sobre la subsecuente inducción de LTP en ratas adultas *in vivo*. Para tal efecto, se indujo la estimulación suficiente para inducir LTP en la CI a animales previamente entrenados en el CAS. Nuestros resultados muestran que el entrenamiento en el CAS modifica la expresión de LTP en la vía de comunicación Bla-CI hasta por 5 días posteriores al entrenamiento. Con el propósito de caracterizar parte de los mecanismos moleculares involucrados en la interacción CAS-LTP de la CI, se infundieron intracorticalmente el ácido 3-(2-carboxipiperazin-4-yl)propil-1-fosfónico (CPP, antagonista del receptor N-metil-D-aspartato: NMDA; 0.05  $\mu$ M), queleritrina (inhibidor de la proteína cinasa C: PKC; 2.6 mM), KT5720 (inhibidor de la proteína cinasa A: PKA; 1.86 mM) y anisomisina (inhibidor de la síntesis de proteínas; 0.37 M). Nuestros resultados muestran que el bloqueo de los receptores NMDA así como la inhibición farmacológica de la PKC y de la síntesis de proteínas en la CI evitan el efecto del entrenamiento en el CAS sobre la inducción subsecuente de LTP en dicha área neocortical. Sin embargo, la inhibición farmacológica de la PKA evita la formación del CAS, pero no el efecto del CAS sobre la LTP en la CI. Nuestros hallazgos demuestran que la historia de actividad de la vía que va del núcleo basolateral amigdalino a la corteza insular modifica de manera persistente la subsecuente inducción de LTP. Estos efectos son mediados por la participación de los receptores NMDA, proteínas cinasas como la PKC y requiere de síntesis de nuevas proteínas.

## ÍNDICE

Glosario de abreviaturas.....	3
<b>1. ANTECEDENTES.....</b>	<b>4</b>
1.1. Potenciación a largo plazo.....	4
1.2. Condicionamiento aversivo a los sabores.....	9
1.3. La corteza insular y la vía gustativa .....	11
1.4. LTP y conducta .....	14
1.5. Plasticidad Homeostática.....	16
1.6. Metaplasticidad.....	17
1.6.1. Modelo BCM.....	18
1.6.2. Mecanismos moleculares de la metaplasticidad.....	20
1.6.3 Metaplasticidad y Conducta.....	21
1.7. CAS y LTP en la corteza insular .....	22
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>23</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>24</b>
<b>4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>25</b>
4.1. Animales.....	25
4.2. Entrenamiento en el CAS. ....	25
4.3. Inducción de la LTP en la CI.....	25
4.4. Curvas entrada-salida (I/O).....	26
4.5. Implantación de cánulas e infusión de sustancias en la CI.....	26
4.6. Histoquímica de Nissl.....	27
4.7. Análisis de Datos. ....	27
<b>5. DISEÑO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>28</b>
5.1. Fase 1 .....	28
5.2. Fase 2 .....	28
5.3. Fase 3 .....	29
5.4. Fase 4 .....	29
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>
6.1. Resultados histológicos.....	31
6.2. Resultados fase 1: el entrenamiento en el CAS modifica la inducción subsecuente de LTP en la CI en ratas adultas <i>in vivo</i> .....	32
6.2.1 Resultados conductuales .....	32
6.2.2. Resultados electrofisiológicos .....	33
6.3. Resultados fase 2: el entrenamiento en el CAS incrementa la excitabilidad de las neuronas de la proyección Bla-CI.....	35
6.3.1. Resultados conductuales.....	35

6.3.2. Resultados electrofisiológicos .....	36
6.4. Resultados fase 3: persistencia del efecto del CAS sobre la inducción de LTP en la CI .....	36
6.4.1. Resultados conductuales.....	36
6.4.2. Resultados electrofisiológicos .....	38
6.5. Resultados fase 4: mecanismos moleculares responsables de la interacción CAS-LTP en la CI.....	39
6.5.1 Resultados conductuales .....	39
6.5.2 Resultados electrofisiológicos .....	40
7. DISCUSIÓN.....	42
7.1. El CAS modifica la habilidad de inducir LTP en la CI.....	42
7.2. El CAS produce un incremento en la excitabilidad neuronal en la vía Bla-CI .....	44
7.3. Persistencia del efecto producido por el CAS sobre la LTP en al CI .....	44
7.4. Mecanismos moleculares.....	45
7.4.1. Receptores NMDA .....	46
7.4.2. PKC.....	46
7.4.3. PKA.....	47
7.4.4. Síntesis de proteínas.....	48
8. CONCLUSIONES .....	50
9. REFERENCIAS .....	51
10. ANEXO 1 .....	60
11. ANEXO 2 .....	69
12. ANEXO 3.....	85

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ACSF	Líquido cefalorraquídeo artificial
ADQ	Adquisición
AHP	Hiperpolarización que sucede al potencial de acción
AMPA	Ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de varianza
AP	Anteroposterior
ARNm	Ácido ribonuclèico mensajero
ATP	Trifosfato de adenosina
BCM	Bienestock, Cooper y Munro
BDNF	Factór neurotrófico derivado del cerebro
Bla	Núcleo basolateral amigdalino
CaMkII	Proteína cinasa dependiente de calcio-calmodulina tipo II
CAS	Condicionamiento aversico a los sabores
CI	Corteza insular
CPP	Ácido 3-2carboxipiperazin-4-propil-1-fosfónico
CREB	Proteína de unión al elemento responsivo a adenosin monofosfato
I/O	Entrada-salida
LiCl	Cloruro de litio
LTP	Potenciación a largo plazo
mGlu	Glutamatérgicos metabotrópicos (receptores)
mTOR	Blanco de la rapamicina en los mamíferos
PA	Prueba de aversión
PBS	Buffer de fosfatos
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PPSEs	Potenciales postsinápticos excitatorios
Ser	Serina
SN	Sistema nervioso
$\theta$ m	Umbral de modificación

## 1. ANTECEDENTES

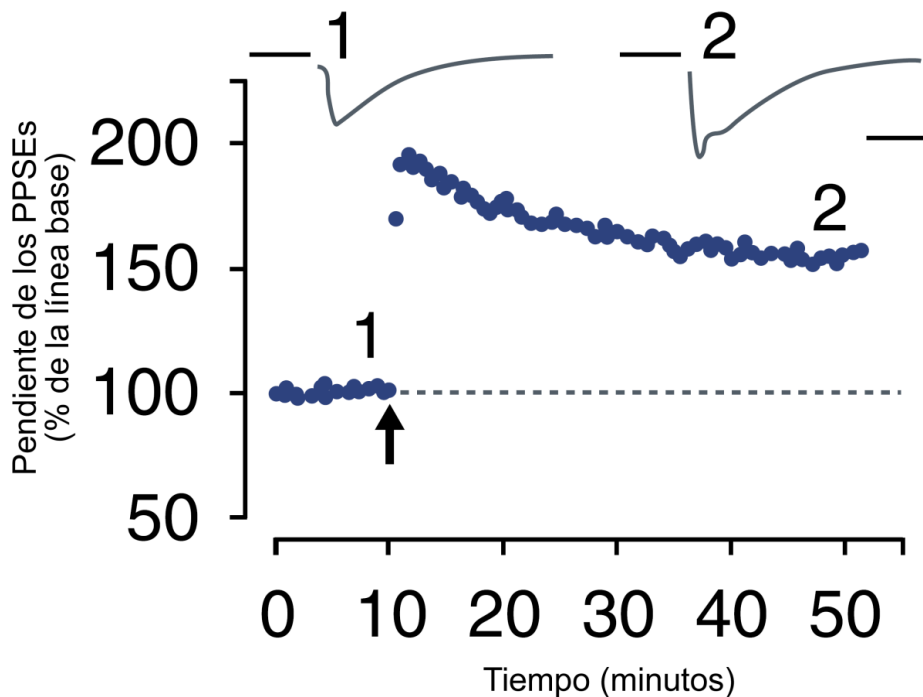
Una de las habilidades más relevantes para la supervivencia de los seres vivos es su capacidad para adaptarse al medio ambiente a través de diversos mecanismos. Por ejemplo, las células del sistema nervioso (SN) cuentan con la capacidad de modificar morfológica y funcionalmente la eficiencia de la transmisión sináptica en respuesta a la actividad. Ésta propiedad de las neuronas es conocida con el nombre de plasticidad sináptica, la cual es definida como cambios en las propiedades sinápticas dependientes de la actividad y es considerada como la base de fenómenos adaptativos como el aprendizaje y la memoria (Milner et al., 1998; Bear et al., 2001; Citri & Malenka, 2008).

Actualmente podemos definir al aprendizaje como el proceso mediante el cual el SN adquiere información, mientras que la memoria es el proceso mediante el cual dicha información es almacenada (Bear et al., 2001). Parte de los estudios tendientes a investigar las bases neurobiológicas que subyacen a la memoria han sido encaminados a describir los cambios plásticos relacionados con el almacenamiento de información, esto es, cambios morfológicos y funcionales en la comunicación sináptica dependientes de la actividad. Actualmente se considera que diversas expresiones de plasticidad sináptica se encuentran involucradas en la formación de la memoria (Kuo et al., 2008; Turrigiano, 2008; Feldman, 2009; Jung & Ziemann, 2009; Langwieser et al., 2010; Turrigiano, 2011). En particular, una de las expresiones de plasticidad sináptica subyacentes al almacenamiento de información que ha sido ampliamente estudiada en las últimas décadas es la potenciación a largo plazo (LTP), que se define actualmente como el incremento prolongado de la eficiencia sináptica dependiente de la actividad (Abraham, 2008). La LTP constituye un fenómeno considerado como esencial para la formación de la memoria (Lømo, 1966; Abraham, 2008; Citri & Malenka, 2008).

### 1.1. Potenciación a largo plazo

La memoria es reflejada en la capacidad de las neuronas para modular las respuestas evocadas por un estímulo y para reactivar una respuesta en ausencia del estímulo que lo provoca (Eichenbaum, 1996). Actualmente se

considera que las modificaciones en la eficiencia sináptica dependientes de la actividad subyacen al aprendizaje y la memoria (Bear, 1996; Citri & Malenka, 2008). A finales de los años 1960 y principios de la década de los 1970's, Bliss y Lømo realizaron una serie de experimentos describiendo que trenes breves de estimulación aplicados en la vía que va del patrón perforante al giro dentado en el hipocampo de conejos, causaban un incremento en la fortaleza de las conexiones sinápticas (Lømo, 1966; Bliss & Gardner-Medwin, 1973; Bliss & Lømo, 1973). Dicho fenómeno se conoce como LTP, siglas en inglés de potenciación a largo plazo (figura 1), el cual es definido en la actualidad como un incremento de larga duración en la eficiencia sináptica dependiente de la actividad (Abraham, 2008). Hoy en día se conoce que es posible inducir LTP en prácticamente todas las áreas del SN (Abraham, 2008; Citri & Malenka, 2008), además de presentarse en diversas especies de animales, como en conejos, gatos, ratas, ratones, invertebrados e incluso en humanos (Roberts & Glanzman, 2003; Kitagawa et al., 2004; Muller et al., 2007; Abraham, 2008; Citri & Malenka, 2008; Dringenberg et al., 2008; Otsubo et al., 2008).



**Figura 1. Ejemplo de potenciación a largo plazo.** La gráfica muestra la pendiente de los potenciales post-sinápticos excitatorios (PPSE) del área CA1 hipocampal antes (1) y después (2) de la estimulación de alta frecuencia (flecha: 100 Hz/1s) en el área CA3 del hipocampo. Los trazos en la parte superior muestran un incremento en la amplitud de los PPSEs después de la aplicación de los trenes (escala: 0.5 mV, 10ms; modificado de Citri y Malenka, 2008).

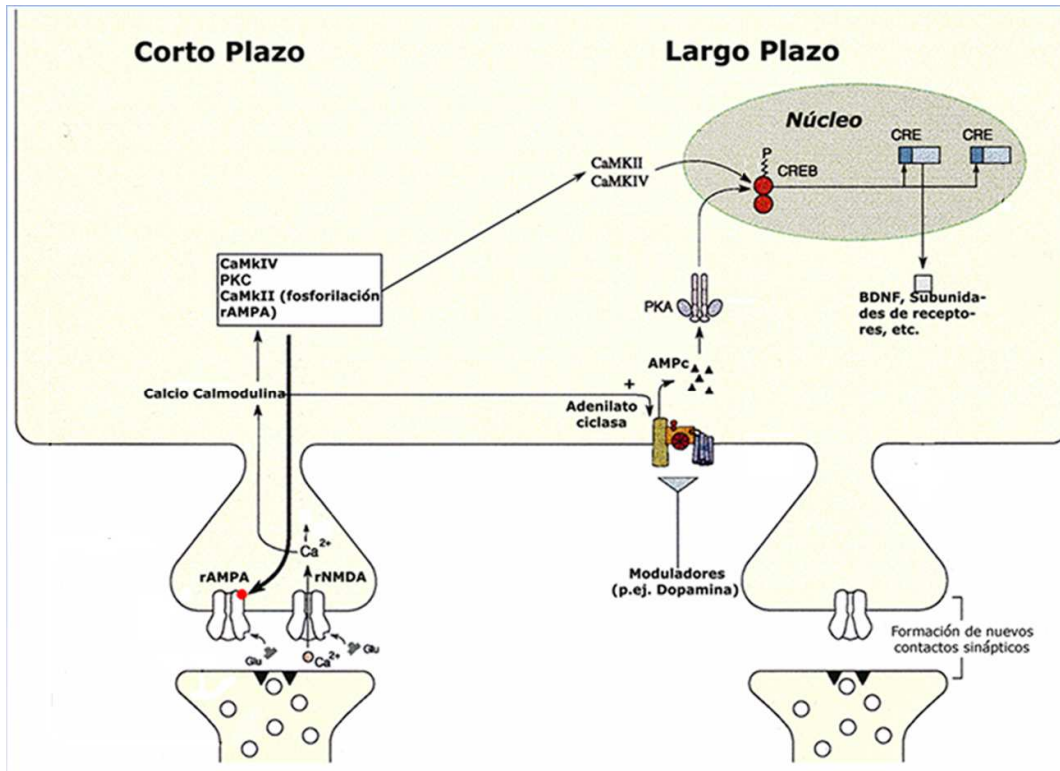


Existen coincidencias en los mecanismos celulares inherentes a la inducción de la LTP en las diferentes áreas en las cuales puede ser inducido el fenómeno (Malenka & Bear, 2004). Particularmente, los mecanismos moleculares de la LTP inducida en la vía de las colaterales de Schaffer a la región CA1 hipocampal han sido ampliamente estudiados y son considerados prototípicos de la LTP (Malinow et al., 2000). Parte de dichos mecanismos serán descritos a continuación.

La actividad sináptica promueve la liberación presináptica del neurotransmisor glutamato, el cual activa a los receptores AMPA (ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico). La activación de dichos receptores da lugar a la entrada de sodio al interior de la célula (figura 2), contribuyendo de esta forma a la despolarización de la membrana postsináptica. En tanto, los receptores NMDA permanecen inactivos, debido a que presentan un bloqueo de magnesio que impide el flujo iónico a través de ellos. A pesar de presentar sitios que son activados con el glutamato, es necesaria la despolarización de la membrana para que los receptores NMDA sean desbloqueados, característica que los hace muy importantes para la plasticidad sináptica (Kandel & Hawkins, 1992). Los receptores NMDA presentan además la característica de que al ser activados no sólo permiten la entrada de iones de sodio al interior de la célula, sino que son permeables también al ion calcio (Jahr & Stevens, 1987; Ascher et al., 1988; Stanton, 1996; Erreger et al., 2005). El calcio también es introducido al interior de la célula por medio de canales de calcio dependientes de voltaje, los cuales son abiertos en respuesta a la despolarización de la membrana. La presencia de calcio al interior de la neurona inicia una cadena de señalización donde intervienen las proteínas cinasas, capaces de transferir grupos fosfato (fosforilar) a sus respectivos sustratos. Un ejemplo es la activación de la calcio-calmodulina cinasa II (CaMKII), que se encuentra relacionada con un aumento en la fosforilación de los receptores AMPA y, por tanto, un incremento en la eficiencia sináptica (Malenka et al., 1989; Malenka & Nicoll, 1999; Malinow & Malenka, 2002; Malenka & Bear, 2004). Asimismo, la calmodulina causa la activación de la adenilato ciclasa, la cual produce monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) a partir de trifosfato de adenosina (ATP) (Lisman, 1989; Blitzer et al., 1998; Makhinson et al., 1999). El AMPC producido activa a la proteína

cinasa A (PKA). Al activarse la PKA, tiene lugar la disociación de sus subunidades catalítica y reguladora, permitiendo la translocación de la subunidad catalítica hacia el interior del núcleo (Hagiwara et al., 1993). Una vez dentro del núcleo, activa factores de transcripción como CREB (elemento responsivo al AMP cíclico) que participan en la modulación de la transcripción de una variedad de genes involucrados en la activación y el mantenimiento de los cambios en la eficiencia sináptica (Wells & Fallon, 2000). Asimismo, existe una familia de al menos 10 distintas proteínas que han sido involucradas en los fenómenos de plasticidad sináptica como la LTP, las PKCs (Taattola, 2004; Yang et al., 2004). Estas proteínas son activadas por calcio y diacilglicerol (Taattola, 2004) y uno de los sustratos de esta cinasa es la subunidad del receptor AMPA GluR1, la cual al ser fosforilada promueve un incremento en la conductancia de dicho canal (Boehm et al., 2006). Por otro lado, se ha demostrado que el mantenimiento de la LTP durante períodos mayores a una hora es dependiente de síntesis de proteínas. Si se bloquea tanto la transcripción de ARN mensajero (ARNm) como la traducción de nuevas proteínas, la LTP decae después de una hora, sin embargo si el bloqueo se realiza una o más horas después de la inducción de potenciación, la LTP permanece inalterada, lo cual pone de manifiesto que la síntesis de nuevas proteínas es necesaria para la persistencia de la LTP en períodos determinados (Wells & Fallon, 2000). Es pertinente mencionar que la síntesis de proteínas no solo se lleva a cabo en los ribosomas que se encuentran en la proximidad del núcleo (en el retículo endoplásmico rugoso) sino que además tiene lugar en las dendritas que cuentan con la maquinaria necesaria para la traducción de nuevas proteínas (Engert & Bonhoeffer, 1999; Toni et al., 1999; Wells & Fallon, 2000; Malenka & Bear, 2004; Citri & Malenka, 2008). Estas nuevas proteínas mantienen en un nivel óptimo la actividad molecular necesaria para sostener los cambios en la eficiencia sináptica, además de promover cambios morfológicos en las espinas dendríticas (Engert & Bonhoeffer, 1999; Toni et al., 1999). En este sentido, se ha descrito recientemente que una isoforma de las PKCs que es conocida como PKM $\zeta$  es necesaria para el mantenimiento de la LTP en el hipocampo y en ciertas áreas neocorticales, ya que su inhibición bloquea tanto la LTP como la memoria de tareas conductuales, incluso horas después de que éstas se han consolidado

(Hrabetova & Sacktor, 1996; Pastalkova et al., 2006; Shema et al., 2007; Sacktor, 2011; Shema et al., 2011).



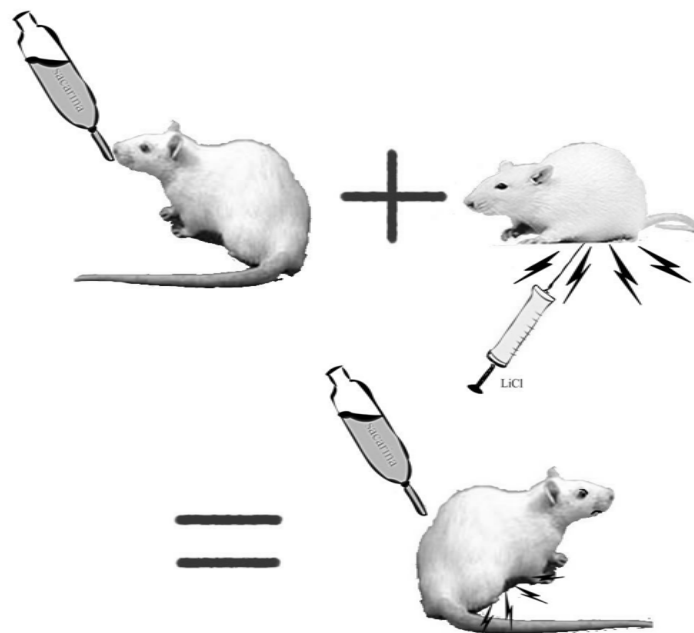
**Figura 2. Mecanismos moleculares de la potenciación a largo plazo.** En éste esquema se muestran parte de los mecanismos moleculares responsables de la LTP. (Modificado de Milner et al., 1998).

Como mencionamos en líneas anteriores, es posible inducir LTP en diferentes áreas del SN, como el hipocampo y la neocorteza (Wang et al., 2006; Wilson et al., 2007). Una de las áreas neocorticales donde se presenta el fenómeno de LTP es la corteza insular (CI), específicamente la proyección que va de el núcleo basolateral amigdalino (BLa) a la CI agranular, vía neuronal que se encuentra involucrada en el condicionamiento aversivo a los sabores (CAS) (Escobar et al., 1998a; Jones et al., 1999).

## 1.2. Condicionamiento aversivo a los sabores

La supervivencia de un organismo está basada entre otras cosas en la capacidad de aprender y recordar que un alimento ingerido fue seguido de malestar, anticipando de esta forma el potencial dañino de cualquier alimento que tenga atributos similares y evitando su consumo. John García describió por

primera vez que las ratas desarrollan aversión a soluciones con sabor dulce cuando estas son seguidas por la aplicación de rayos gamma (Garcia et al., 1955). En posteriores experimentos del mismo grupo de investigación, el estímulo aversivo utilizado fue el cloruro de litio (LiCl). En este sentido, García y Koellin en 1966 demostraron que una solución con sabor se asocia más fácilmente a la inducción de náusea que a la aplicación de choques eléctricos en las patas, lo cual nos muestra que en este condicionamiento, donde el estímulo condicionado es el sabor, es importante que el estímulo aversivo sea de tipo visceral (Garcia & Koelling, 1966). A esta conducta de rechazo basada en el aprendizaje se le llamó condicionamiento aversivo a los sabores o CAS (figura 3). El CAS es un tipo de condicionamiento, donde el sabor sirve como estímulo condicionado y el malestar gástrico como estímulo incondicionado, de modo que un estímulo gustativo adquiere la capacidad de inducir una respuesta condicionada. Los animales pueden aprender el CAS si la solución con sabor es ingerida espontáneamente, pero también presentan el aprendizaje de la tarea cuando el estímulo aversivo es inyectado por vía intraperitoneal o intravenosa (Bradley & Mistretta, 1971; Bures & Buresova, 1989).



**Figura 3. Condicionamiento aversivo a los sabores.** Cuando un sabor novedoso es asociado con un malestar gástrico (inyección de LiCl) da como resultado que en las siguientes presentaciones del sabor, éste evoque un malestar gástrico. Esto causa que el animal muestre aversión a dicho sabor, evitando su consumo.

A continuación se presentarán 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 (Garcia et al., 1985).

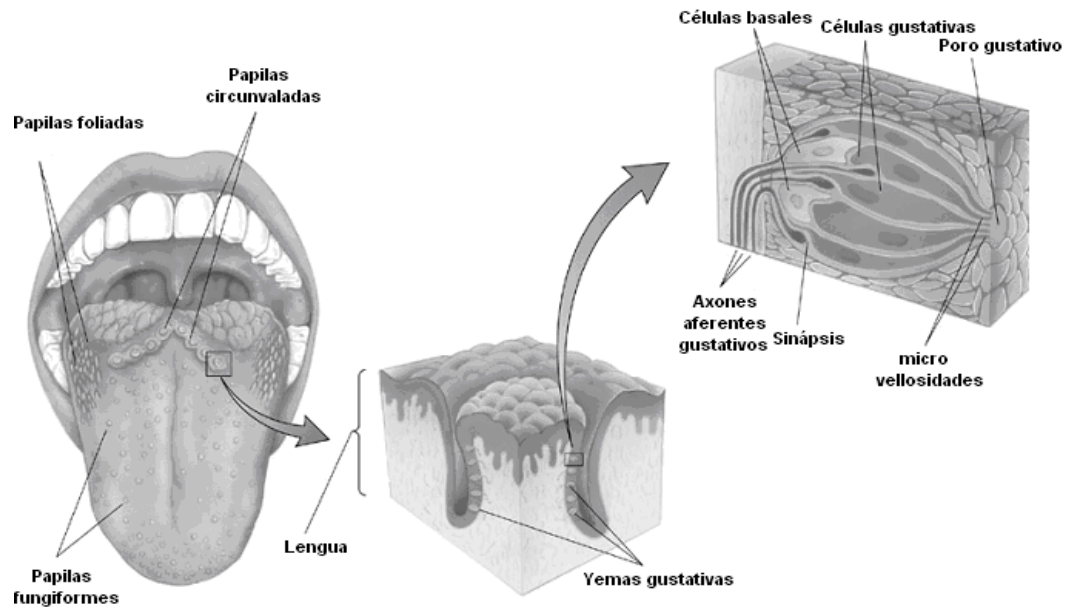
2. La fuerza de la aversión aprendida está directamente relacionada con la intensidad del sabor y del malestar, y está inversamente relacionada al intervalo entre la presentación del sabor y la inducción de malestar. Este intervalo puede durar horas, a diferencia de otros condicionamientos, en los cuales es necesario que el intervalo entre el estímulo condicionado y la respuesta incondicionada sea de segundos (Domjan, 1985).

3. Los estímulos gustativos se asocian más fácilmente a estímulos gástricos (Garcia & Koelling, 1966).

Numerosos experimentos han demostrado que lesiones bilaterales de la CI deterioran el aprendizaje y la evocación del CAS (Bermúdez-Rattoni, 2004; Bermúdez-Rattoni et al., 2005), sin embargo no parece afectar la percepción del sabor, ya que los animales con lesión en la CI pueden discriminar entre diferentes concentraciones de sacarosa y NaCl (Lasiter et al., 1985). Estudios electrofisiológicos mediante estimulación gustativa y evocación de señales de la lengua a la corteza gustativa sugieren que los estímulos gustativos están confinados a la CI (Bermúdez-Rattoni, 2004; Bermúdez-Rattoni et al., 2005; Bernstein & Koh, 2007). A este respecto, estudios electrofisiológicos donde se evocan señales en la corteza gustativa mediante estimulación lingual sugieren que el CAS promueve cambios en la actividad de la CI (Yamamoto et al., 1989; Grossman et al., 2008). De manera similar, se ha reportado que el CAS es capaz de producir cambios en la actividad de genes de expresión temprana como c-fos (Bernstein & Koh, 2007) e incluso modifica los mapas sensoriales de la CI en ratas (Accolla & Carleton, 2008). Además, la CI se ha visto involucrada también en otras tareas de aprendizaje de tipo aversivo, como la prevención pasiva o el laberinto de agua de Morris (Escobar et al., 1989; Bermúdez-Rattoni & McGaugh, 1991; Bermúdez-Rattoni, 2004).

### 1.3. La corteza insular y la vía gustativa

La CI es el relevo final de la vía gustativa. Los vertebrados detectamos los sabores por medio de la activación de células quimiorreceptoras las cuales responden a moléculas o iones que están disueltos en la saliva. Estas células, junto con células basales y de soporte forman las yemas gustativas (figura 4). Las yemas gustativas son consideradas los órganos sensoriales del sentido del gusto. Tanto en el humano como en la rata, la ubicación de las yemas gustativas dentro de la cavidad oral se observa en pequeñas protuberancias del epitelio de la lengua denominadas papilas. Por su forma se pueden distinguir tres tipos de papilas gustativas distribuidas en la lengua: circunvaladas, foliadas y fungiformes. Es relevante mencionar que tanto el paladar como la faringe, epiglotis y parte superior del esófago presentan yemas gustativas pero solo las yemas que se encuentran en la lengua están agrupadas en papilas (Bear, 1996).

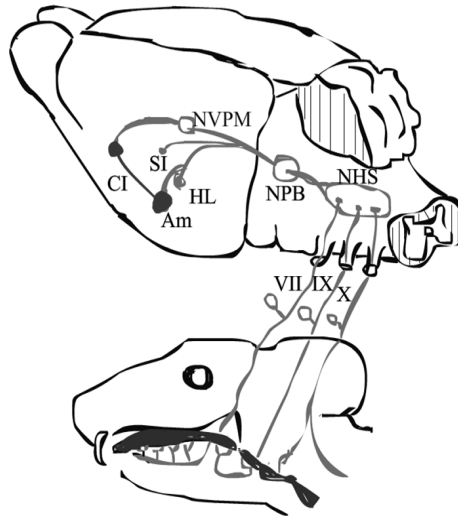


**Figura 4. La lengua, las papilas y las yemas gustativas.** Imagen que muestra la ubicación de las papilas gustativas en la lengua, las yemas gustativas dentro de las papilas y las células que forman las yemas gustativas (modificado de Bear et al., 2001).

Los pares craneales VII (facial), IX (glossofaríngeo), y X (vago) llevan información de las yemas gustativas (figura 5). El nervio facial lleva información de las papilas fungiformes que se encuentran en la parte posterior de la lengua, así como de las yemas gustativas localizadas en el paladar y en el conducto nasoincisor. El nervio glossofaríngeo lleva información de las papilas foliadas y

circunvaladas que se encuentran en la parte posterior de la lengua, mientras que el nervio vago lleva información de las yemas gustativas de la epiglotis laríngea y esófago. Por otra parte, el nervio trigémino inerva la periferia de las yemas gustativas y transmite información somatosensorial, textura y temperatura de los alimentos (Reutter & Witt, 1993). Los tres nervios, facial, glossofaríngeo y vago, hacen sinapsis en el núcleo del haz solitario. Después de dicho relevo las diferencias entre el sistema gustativo de los humanos y de las ratas se hacen evidentes. En las ratas, el segundo relevo de la vía gustativa se encuentra en el núcleo parabraqueal del puente, en lo que se ha denominado como área gustativa del puente (Norgren & Leonard, 1971). Una vez ahí se reconocen dos rutas: una primera ruta se proyecta hacia estructuras ventrales del cerebro basal como la amígdala, la zona ventral del hipocampo, y la sustancia innominada mientras que una segunda ruta se proyecta hacia el complejo ventrobasal del tálamo, el cual se comunica con la CI agranular (Gerfen & Clavier, 1979). En el humano las fibras eferentes provenientes del núcleo del haz solitario se proyectan rostralmente hacia el núcleo parabraqueal del puente, pero no hacen sinapsis hasta el núcleo ventroposteromedial del tálamo en su división parvocelular (Norgren & Leonard, 1973), que a su vez envía sus eferencias a la ínsula anterior y al operculum frontal, por lo cual estas dos zonas son consideradas como la corteza gustativa primaria en los humanos (Pritchard et al., 1986; Kinomura et al., 1994).

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



**Figura 5. La vía gustativa en ratas.** Esquemas donde se muestra la vía gustativa en las ratas. (Abreviaturas: VII, nervio facial; IX, nervio glossofaríngeo; X, nervio vago; NHS, núcleo del haz solitario; NPB, núcleo parabrancial del puente; NVPM, núcleo ventroposteromedial del tálamo; CI, corteza insular; SI, sustancia innominada; HL, hipotálamo lateral; Am amígdala).

El CAS es una tarea de aprendizaje que requiere la formación de un trazo de memoria aversiva mediante la asociación de dos estímulos que son relacionados en la CI. En primer lugar se encuentra el estímulo gustativo, el cual activa la vía gustativa hasta su relevo final en la CI para la formación del trazo de memoria gustativa de tipo "seguro". En segundo lugar se encuentra el estímulo aversivo, el cual activa a la CI a través de la amígdala para la formación de un trazo de memoria gustativa de tipo "aversivo" (Bermúdez-Rattoni, 2004; Bermúdez-Rattoni et al., 2005). Para la formación del trazo de memoria gustativa de tipo seguro, se ha propuesto que el estímulo gustativo incrementa los niveles de acetilcolina en la CI, proveniente de la conexión de ésta corteza con el núcleo basalis magnocelularis. La acetilcolina activa a receptores de tipo muscarínicos en la CI, los cuales promueven la activación de la PKC, la cual tiene injerencia en la modulación de los receptores NMDA y en la activación de otras cinasas como ERK. Por otro lado, para la formación del trazo de memoria gustativa de tipo aversivo, se ha observado que el malestar gástrico incrementa los niveles de glutamato en la CI debido a la activación de la vía amígdalo-cortical, lo cual promueve la entrada de calcio al interior de las neuronas en dicha corteza, iniciando cambios plásticos dependientes de la actividad (Bermúdez-Rattoni, 2004; Bermúdez-Rattoni et al., 2005). Actualmente se considera que la conjunción de los mecanismos del trazo



gustativo y del trazo aversivo en la CI activan diferentes proteínas relacionadas con la plasticidad como la misma PKC o la PKA, que son parte de una cadena molecular que culmina con la activación de genes de expresión temprana como CREB, los cuales promueven la síntesis de nuevas proteínas relacionadas con el mantenimiento de la memoria del CAS (Yasoshima et al., 2000; Bermúdez-Rattoni, 2004; Bermúdez-Rattoni et al., 2005). Interesantemente, diversas proteínas que se encuentran relacionadas con la formación y el mantenimiento del CAS se encuentran también relacionadas con la expresión de la LTP en la CI, lo cual sugiere una coincidencia de mecanismos entre estos dos fenómenos (Escobar et al., 1998a; Escobar & Bermudez-Rattoni, 2000; Escobar et al., 2002)

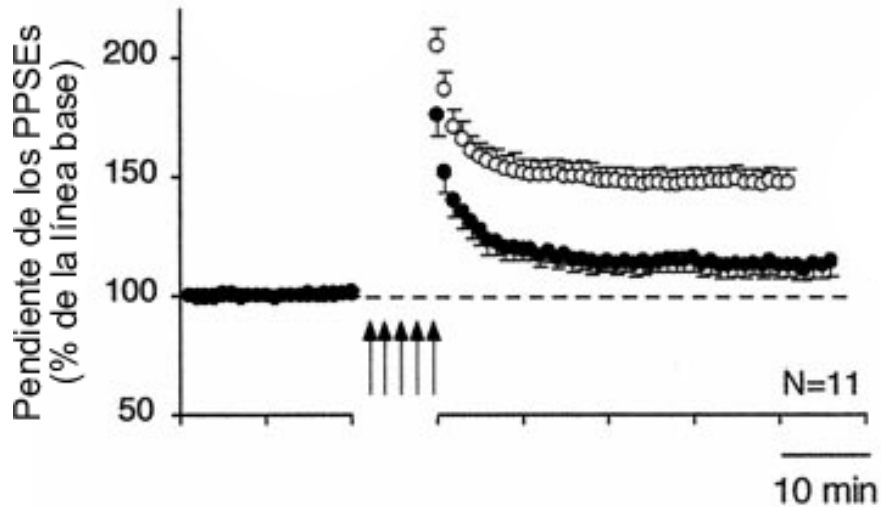
#### **1.4. LTP y conducta**

Hoy en día, existen evidencias sólidas a favor de una relación entre el aprendizaje y la LTP. Por ejemplo, los resultados de Rogan et al. en 1997 y de McKernan et al. en el mismo año sugieren que el condicionamiento al miedo causa incrementos en la pendiente y amplitud de los potenciales postsinápticos excitatorios (PPSEs) en la amígdala lateral en ratas adultas *in vivo* e *in vitro* (McKernan & Shinnick-Gallagher, 1997; Rogan et al., 1997). En una investigación más reciente se encontró que el entrenamiento en la tarea de prevención pasiva induce LTP en el área CA1 hipocampal (Whitlock et al., 2006). Los estudios mencionados muestran que los cambios en la eficiencia sináptica dependientes del entrenamiento en tareas conductuales se ven representados en distintas áreas del SN.

De manera similar, en 1998 Rioult-Pedotti et al. demostraron que el aprendizaje en habilidades motoras (motor skill learning) incrementa la amplitud de los PPSEs en la corteza motora primaria del hemisferio entrenado con respecto a la corteza motora primaria del hemisferio contralateral, el cual sirvió como control (Rioult-Pedotti et al., 1998).

El mismo grupo de investigación entrenó a un grupo de ratas en la mencionada tarea para posteriormente inducir LTP y LTD en el hemisferio entrenado. Sus resultados mostraron que la LTP fue significativamente reducida mientras que la LTD fue significativamente incrementada en el

hemisferio entrenado (figura 6), comparado con el hemisferio contralateral, utilizado como control (Rioutl-Pedotti et al., 2000).



**Figura 6. El entrenamiento en habilidades motoras modifica la inducción subsecuente de plasticidad sináptica en la corteza motora.** El entrenamiento en tareas motoras disminuye la magnitud de la LTP. Círculos negros: hemisferio entrenado. Círculos blancos: hemisferio no entrenado (Modificado de Rioutl-Pedotti et al., 2000).

Las investigaciones descritas muestran que el entrenamiento en tareas conductuales es capaz de incrementar la eficiencia sináptica de una vía específica de manera análoga a la potenciación inducida por actividad repetitiva, sugiriendo que la LTP es una expresión plástica que forma parte de los mecanismos mediante los cuales es almacenada la información. Además, el efecto producido por la conducta sobre la habilidad de inducir subsecuente plasticidad sináptica guarda una estrecha relación con un fenómeno descrito por Abraham y Bear en 1996, quienes introdujeron al lenguaje de la neurociencia el término “metaplasticidad” (Abraham & Bear, 1996), el cual es considerado como un mecanismo de plasticidad homeostática que será descrito a continuación.

### 1.5. Plasticidad Homeostática

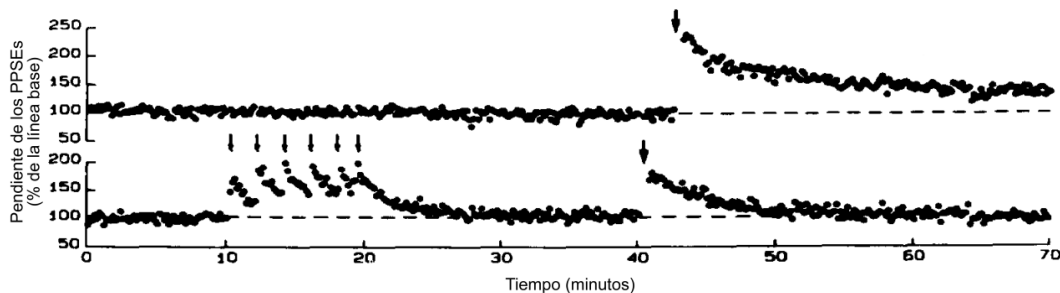
Las células en el SN reciben constantemente estímulos de otras neuronas y existen diversos mecanismos plásticos que modulan las respuestas neuronales ante dicha estimulación. Específicamente, se han distinguido dos tipos de plasticidad sináptica (Pérez-Otaño & Ehlers, 2005; Turrigiano, 2008;

Turrigiano, 2011). En primer lugar, se encuentran las modificaciones plásticas de tipo “hebbiano”, las cuales tienden a desestabilizar las propiedades neuronales, produciendo cambios persistentes en la comunicación neuronal. Por ejemplo, los cambios en la eficiencia sináptica tales como la LTP y la LTD son considerados plasticidad hebbiana, ya que la actividad desestabiliza las propiedades sinápticas dando lugar a un aumento o decremento persistente en la eficiencia sináptica. En segundo lugar existen las modificaciones plásticas “no hebbianas” que son también conocidas como “plasticidad homeostática”. En éste tipo de plasticidad, las neuronas inician una serie de mecanismos homeostáticos con el fin de mantener los niveles de eficiencia sináptica en un rango determinado, resistiéndose de este modo a las modificaciones abruptas. Sin plasticidad homeostática, fenómenos como la LTP o la LTD provocarían niveles de actividad extremos que podrían producir el deceso de las células neuronales, ya sea por exceso o por falta de actividad. De manera similar, sin mecanismos homeostáticos operando a nivel de los contactos sinápticos, sería imposible conservar el patrón de actividad eléctrica característico de cada vía. (Turrigiano & Nelson, 2004; Pérez-Otaño & Ehlers, 2005). El SN cuenta con mecanismos específicos para mantener el equilibrio de dichas funciones neuronales. Por ejemplo, puede modificar la posibilidad de inducir plasticidad sináptica subsecuente (metaplasticidad), mecanismo que tiende a conservar la eficiencia de las conexiones sinápticas en un rango determinado (Pérez-Otaño & Ehlers, 2005; Abraham, 2008).

### **1.6. Metaplasticidad**

Como mencionamos en líneas anteriores, la actividad de las neuronas produce diferentes tipos de plasticidad sináptica. En este sentido, la actividad neuronal puede inducir incrementos o decrementos en la eficiencia sináptica, así como cambios homeostáticos, dependiendo del tipo de estimulación que sea aplicada a las células neuronales. Por ejemplo, en las colaterales de Shaffer, se ha reportado que se puede inducir LTP con estimulación de 50 Hz, 100 Hz, 200 Hz y con estimulación theta. Análogamente, es posible inducir LTD en la misma vía con 1 Hz o con 5 Hz de estimulación y para cada protocolo de estimulación se presenta un cambio en la eficiencia sináptica de diferente magnitud (Zakharenko et al., 2003; Artola et al., 2006). Sin embargo, existen

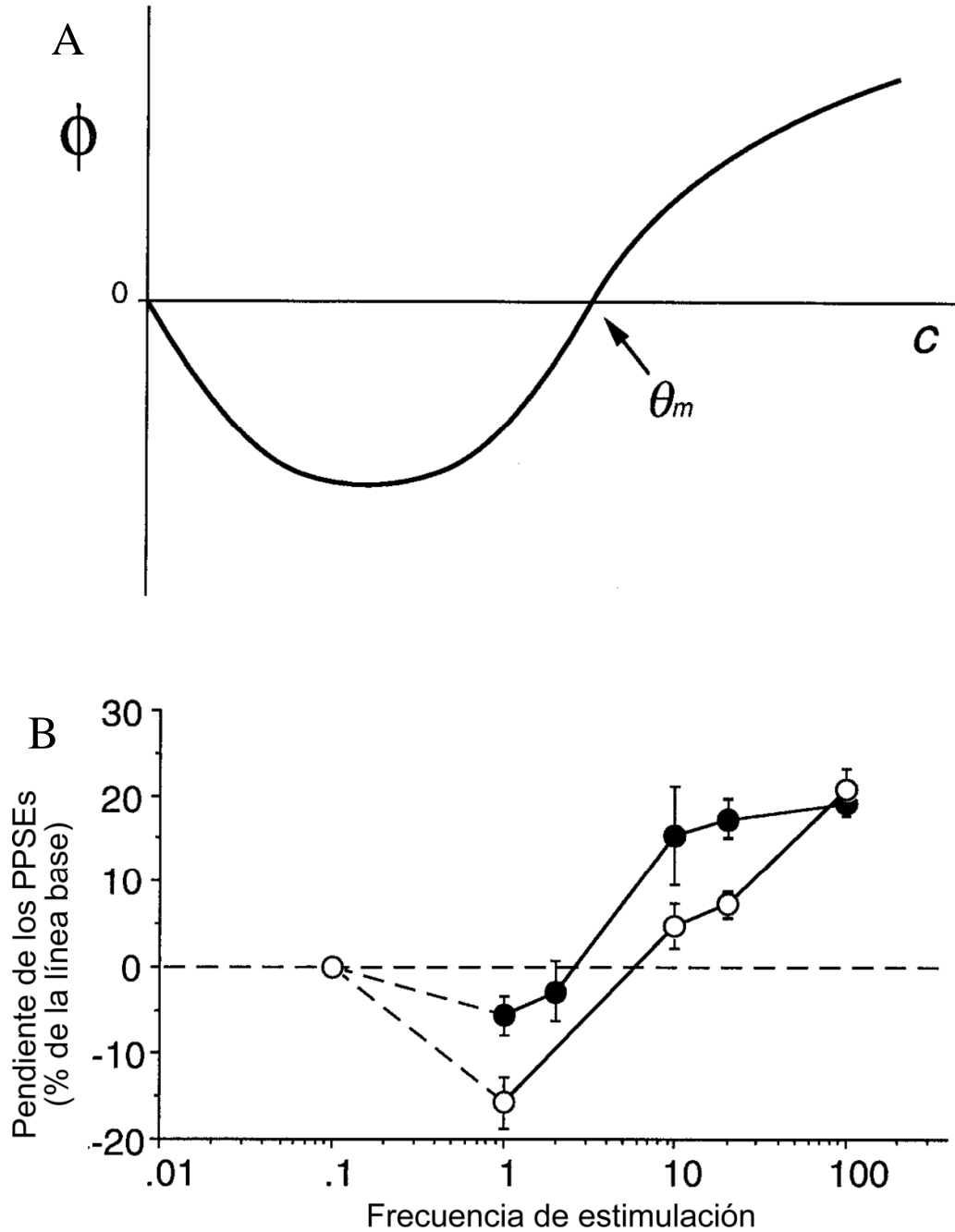
frecuencias de estimulación con las cuales no se presentan ni LTP ni LTD en las colaterales de Shaffer. La estimulación sináptica de baja frecuencia (30 Hz) en dicha proyección produce una potenciación a corto plazo, es decir, que el aumento en la eficiencia sináptica tiene una duración de más de 30 minutos, pero menos de una hora. Después de éste tiempo la eficiencia sináptica vuelve a la línea basal y aparentemente no se produce ningún cambio en la vía (Malenka, 1991). Sin embargo el cambio se observa cuando se induce LTP en la misma vía que fue previamente estimulada, estos cambios incluyen una inhibición de la LTP y una facilitación de la LTD (Huang et al., 1992; Abraham & Bear, 1996). A dicho fenómeno se le conoce como metaplasticidad, el cual es definido como "un cambio en la posibilidad de inducir plasticidad sináptica subsecuente" (Abraham & Bear, 1996; figura 7). La metaplasticidad es un fenómeno donde la actividad es capaz de modificar el umbral para la inducción de plasticidad sináptica, resistiéndose a los cambios abruptos en la eficiencia sináptica y conservando la excitabilidad de las neuronas en un nivel determinado (Abraham & Bear, 1996; Bear, 1996). El cómo y bajo qué condiciones se modulan dichos umbrales es una interesante cuestión que se ha abordado tanto desde el punto de vista de los modelos matemáticos como experimentalmente.



**Figura 7. Efectos de la estimulación previa sobre la inducción de LTP en el área CA1 hipocámpal.** En una situación experimental donde normalmente se puede inducir el fenómeno de la LTP (arriba), la potenciación es inhibida debido a la previa estimulación de baja frecuencia (abajo; modificado de Huang et al. 1992).

### 1.6.1. Modelo BCM

En 1982, Bienestock, Cooper y Munro propusieron la existencia de un umbral de activación postsináptica, es decir, que una vía es potenciada cuando la activación postsináptica excede un valor crítico llamado umbral de modificación o " $\theta_m$ " mientras que una vía es depotenciada cuando la activación



**Figura 8. Modelo BCM.** A. La gráfica muestra que la bidireccionalidad de los cambios en la eficiencia sináptica ( $\Phi$ ) es dependiente de la frecuencia de estimulación ( $c$ ), induciéndose LTD en respuesta a las bajas frecuencias y LTP en respuesta a las altas frecuencias. B. Evidencia experimental de la modificación del umbral  $\theta_m$  en ratas con privación visual (círculos negros) y ratas normales (círculos blancos; modificado de Bear, 1996).

postsináptica es mayor que cero pero menor que el valor  $\theta_m$  (figura 8). A éste modelo se le conoce como BCM y es importante mencionar que dicho umbral no es fijo (Cooper et al., 1979; Bienenstock et al., 1982). La frecuencia de estimulación es directamente proporcional a la activación de la postsinapsis. Lo

anterior se ve reflejado en que a frecuencias más altas se presente una mayor activación de la postsinapsis mientras que a frecuencias más bajas la activación es menor (Bear, 1996). La relación ya mencionada entre la frecuencia de estimulación y la direccionalidad de los cambios en la eficiencia sináptica es explicada mediante el hecho de que la cantidad de calcio que ingresa a la célula neuronal es dependiente de la frecuencia mediante la cual es estimulada la neurona (Jedlicka, 2002; Bear, 2003). De hecho, se ha reportado que cuando se aplica estimulación que induce LTP, pero es inhibida parcialmente la entrada de calcio a la célula, se presenta LTD (Taniike et al., 2008). Entonces, bajas frecuencias están asociadas a bajas cantidades de calcio (menor a  $0.5 \mu\text{M}$ ) y por lo tanto a la inducción de LTD, mientras que las altas frecuencias están asociadas a un mayor ingreso de calcio (mayor a  $0.5 \mu\text{M}$ ) y por lo tanto a la inducción de LTP (Cormier & Kelly, 1996; Jedlicka, 2002). El modelo BCM fue inicialmente propuesto para explicar los cambios plásticos en la corteza visual de gatos durante las primeras etapas de su desarrollo, pero actualmente se considera que un cambio en el umbral  $\theta_m$  explica los cambios en la posibilidad de inducir plasticidad sináptica subsecuente en diversas áreas del SN (figura 8; Bienenstock et al., 1982; Abraham, 2008).

### ***1.6.2. Mecanismos moleculares de la metaplasticidad***

En la actualidad, se conocen parte de los mecanismos moleculares mediante los cuales el umbral para inducir plasticidad sináptica subsecuente es modulado. Se sabe que para modificar dicho umbral es necesario modular las acciones del calcio en el interior de la célula en respuesta de la actividad, para lo cual la célula cuenta con una serie de mecanismos moleculares que serán mencionados a continuación (Nishiyama et al., 2000).

La modulación de la actividad de proteínas cinasas y fosfatasas puede modificar el umbral para la inducción de plasticidad sináptica. Por ejemplo, el aumento en los niveles de calcio en el citoplasma de la célula neuronal promueve la autofosforilación de la CaMKII. Al autofosforilarse, la actividad de la CaMKII es independiente del calcio, lo cual impide que ésta proteína responda a la actividad sináptica subsecuente. (Jedlicka, 2002; Bear, 2003; Zhang et al., 2005).

Por otro lado, se ha propuesto un mecanismo mediante el cual los cambios en el umbral  $\theta_m$  son dependientes de la proporción de las subunidades del receptor NMDA (Quinlan et al., 1999; Quinlan et al., 2004; Philpot et al., 2007). La subunidad NR2A tiene una cinética más rápida, es decir, los canales NMDA que contienen la subunidad NR2A abren y cierran un mayor número de veces que cuando dichos canales contienen la subunidad NR2B (Erreger et al., 2005). Este efecto produce que los receptores NMDA que contengan subunidades NR2A, presenten una mayor resolución (es decir, responde más efectivamente) ante los estímulos de alta frecuencia, como los que inducen LTP, mientras que los que contengan la subunidad NR2B tendrán una mayor resolución ante estímulos de baja frecuencia, como los que inducen LTD (Quinlan et al., 2004; Pérez-Otaño & Ehlers, 2005). La actividad produce un aumento en los receptores NMDA que contienen la subunidad NR2A en el espacio sináptico, haciendo que se requieran frecuencias más altas para introducir la misma cantidad de calcio, modificando el umbral  $\theta_m$  (Pérez-Otaño & Ehlers, 2005). Esto provoca que con una determinada frecuencia de estimulación se induzca una LTP de menor magnitud. De la misma forma, la LTD es más fácil de inducir, ya que con frecuencias con las que normalmente se induce LTP, se induce LTD o no se presenta ningún cambio en la eficiencia sináptica (Philpot et al., 2001; Pérez-Otaño & Ehlers, 2005; Philpot et al., 2007).

La modificación en el umbral  $\theta_m$  también es atribuida a la modulación en las propiedades de canales iónicos dependientes de voltaje que se encuentran relacionados con las corrientes AHP (siglas en inglés para la hiperpolarización que sucede al potencial de acción). Se ha reportado que la activación de receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGlu) pueden reducir la corriente AHP, modificando la posibilidad de inducir LTP (Cohen et al., 1999; Abraham, 2008). Además, se ha visto que la estimulación de alta frecuencia puede hacer más rápida la AHP por unos minutos. Es interesante mencionar que dicho fenómeno es independiente de la PKC pero depende de la PKA y está asociado a una modificación del umbral  $\theta_m$  hacia la izquierda, lo cual se ve reflejado como una facilitación en la inducción de LTP (ver figura 8; Blitzter et al., 1995; Abraham, 2008).

### **1.6.3 Metaplasticidad y Conducta**

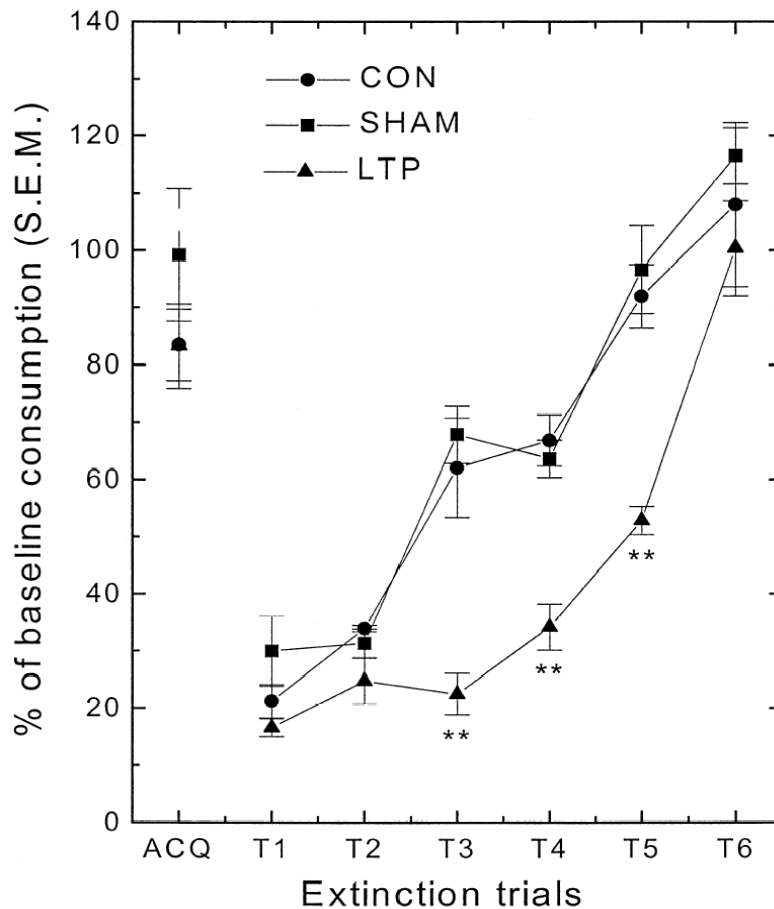
La plasticidad homeostática es actualmente considerada como un fenómeno que tiene especial importancia para la modulación de la actividad en el SN. Así como la plasticidad homeostática es un mecanismo muy importante para la adaptación y protección de las células neuronales, es relevante subrayar que dichos mecanismos tienen un papel crucial en fenómenos como el aprendizaje y la memoria (Abraham, 2008; Turrigiano, 2008; Turrigiano, 2011). A este respecto, los cambios metaplásticos se encuentran representados en diversas áreas del SN central como la neocorteza o el hipocampo, áreas que se consideran como el almacén de diversos tipos de memoria (Bear, 1996). Cambios metaplásticos inducidos por la conducta han sido reportados en diferentes áreas del SN, como en la amígdala lateral debido al condicionamiento al miedo (Schroeder & Shinnick-Gallagher, 2005; Hong et al., 2011). Ejemplos de áreas neocorticales donde se ha inducido cambios metaplásticos debido al entrenamiento en tareas conductuales son la corteza motora debido al entrenamiento de tareas motoras (Rioullet-Pedotti et al., 2000), la corteza piriforme debido a tareas de discriminación olfativa (Quinlan et al., 2004), la corteza visual en respuesta a la estimulación visual (Philpot et al., 2007) la corteza somatosensorial debido a la estimulación de las vibrisas (Clem et al., 2008) e incluso se han reportado cambios metaplásticos in vivo en la corteza motora en respuesta al entrenamiento en habilidades motoras (Monfils & Teskey, 2004). Estas evidencias sugieren que los cambios metaplásticos forman parte de las modificaciones sinápticas involucradas en el almacenamiento de la memoria de tareas conductuales en la neocorteza.

### **1.7. CAS y LTP en la corteza insular**

Como se mencionó en líneas anteriores, el entrenamiento previo en tareas conductuales produce un efecto metaplástico que modifica la inducción subsecuente de LTP. Además, existen evidencias que muestran que la previa inducción de la LTP también puede modificar el entrenamiento en tareas conductuales (Moser et al., 1998; Escobar & Bermudez-Rattoni, 2000). En 1998 Moser et al. observaron que la saturación de LTP en la vía perforante



disminuye la memoria espacial (Moser et al., 1998). Esta relación entre la LTP y el aprendizaje de tareas no es exclusiva del hipocampo. Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que la inducción de LTP en la CI antes del CAS, provoca una disminución en el consumo de sacarina durante las pruebas de extinción comparados con los grupos controles a los cuales no se les indujo LTP previa al entrenamiento en dicha tarea (Escobar & Bermudez-Rattoni, 2000). Éstas evidencias nos muestra que los mecanismos mediante los cuales actúa la LTP tienen coincidencias con los mecanismos de los cuales dependen dichas tareas conductuales. Sin embargo, actualmente no se conoce el efecto que tiene el entrenamiento en el CAS sobre la inducción subsecuente de LTP en la CI.



**Figura 9. La inducción previa de LTP en la CI incrementa la retención del CAS.** La gráfica muestra que la previa inducción de LTP en la CI (LTP) modifica la curva de extinción en comparación con animales a los cuales no se les indujo LTP (CON) y animales a los cuales se les indujo actividad que no produce LTP (SHAM; tomado de Escobar y Bermúdez-Rattoni, 2000).

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existen evidencias que sugieren que el entrenamiento en el CAS puede tener injerencia sobre la LTP inducida en la CI. Estudios previos de nuestro grupo demuestran que la estimulación tetánica de la amígdala basolateral induce LTP en la CI agranular de ratas adultas *in vivo* (Escobar et al., 1998a; Escobar et al., 1998b; Escobar et al., 2002). Asimismo, se ha reportado que el entrenamiento en ciertas tareas conductuales modifica la eficiencia sináptica (McKernan & Shinnick-Gallagher, 1997; Rogan et al., 1997; Whitlock et al., 2006), así como la subsecuente inducción de LTP (Rioutl-Pedotti et al., 2000; Monfils & Teskey, 2004; Quinlan et al., 2004; Schroeder & Shinnick-Gallagher, 2004; Philpot et al., 2007). En un estudio previo de nuestro grupo de investigación, observamos que la inducción de LTP previa al entrenamiento en el CAS aumenta la retención de dicho condicionamiento (Escobar & Bermudez-Rattoni, 2000). Por ello, en la presente investigación analizamos la influencia del entrenamiento en el CAS sobre la inducción subsecuente de LTP en la proyección Bla-CI de ratas adultas *in vivo*.

Aunado a lo anterior, se ha reportado que el entrenamiento en tareas conductuales puede modificar persistentemente la posibilidad de inducir LTP (Schroeder & Shinnick-Gallagher, 2005), por lo que en ésta investigación también analizamos el curso temporal del efecto del entrenamiento en el CAS sobre la inducción subsecuente de LTP en la CI.

Por otro lado, se ha reportado que el CAS es inhibido en diferentes etapas de su formación: por ejemplo, se obstruye la inducción del CAS al ser bloqueados los receptores NMDA, mientras que la consolidación del CAS puede ser bloqueada al inhibir la PKC, la PKA o la síntesis de nuevas proteínas (Berman & Dudai, 2001; Escobar et al., 2002; Nunez-Jaramillo et al., 2007; Moguel-Gonzalez et al., 2008). Por ello, en la presente investigación analizamos si el efecto del CAS sobre la LTP en la vía Bla-CI es afectado al bloquear farmacológicamente el CAS por medio del antagonista de los receptores NMDA (ácido 3-carboxipiperazin-4-propil-1-fosfónico: CPP), los inhibidores específicos para la proteínas cinasa C (PKC; queleritrina) y A (PKA; KT5720) respectivamente o a través de la inhibición de la síntesis de proteínas empleando anisomicina.

### 3. OBJETIVOS

Considerando tales antecedentes, el presente proyecto se plantea los siguientes objetivos:

- Analizar la influencia del entrenamiento del condicionamiento aversivo a los sabores sobre la subsecuente inducción de la potenciación a largo plazo en la vía de comunicación que va del núcleo basolateral amigdalino a la corteza insular agranular de ratas adultas *in vivo*.
- Investigar la influencia del entrenamiento del condicionamiento aversivo a los sabores sobre la excitabilidad neuronal de la vía de comunicación que va del núcleo basolateral amigdalino a la corteza insular agranular de ratas adultas *in vivo*.
- Caracterizar el curso temporal de la modificación producida por el condicionamiento aversivo a los sabores sobre la inducción subsecuente de la potenciación a largo plazo en la corteza insular.
- Caracterizar parte de los mecanismos moleculares involucrados en el efecto del condicionamiento aversivo a los sabores sobre la inducción subsecuente de la potenciación a largo plazo en la corteza insular.

## **4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

### **4.1. Animales.**

Para la presente investigación se utilizaron 153 ratas macho de la cepa Wistar con pesos de 350-380g, las cuales se mantuvieron en cajas individuales de acrílico y estuvieron bajo un ciclo de luz-oscuridad 12h/12h a una temperatura promedio de 27°C, con comida y agua ad libitum (excepto en las fases experimentales que especifiquen lo contrario).

### **4.2. Entrenamiento en el CAS**

Al inicio del entrenamiento en el CAS, los animales fueron privados de agua por 24 horas. Posteriormente se les entrenó para beber agua dos veces al día (10:00 y 18:00 horas) durante 10 minutos por cada sesión de entrenamiento en un periodo de cuatro días durante los cuales se estableció la línea base de consumo. Los bebederos fueron construidos 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; 5.46 mM). Después de 10 minutos de la presentación del estímulo novedoso, se administró una dosis intraperitoneal de cloruro de litio (LiCl; 0.2 M; 9.37 ml/Kg) para inducir el malestar gástrico. Después de la sesión de adquisición, a las ratas se les proporcionó de nueva cuenta agua dos veces al día con el fin de restablecer la línea base de consumo de agua. Una vez restablecida la línea base, el agua fue sustituida nuevamente por la solución de sacarina 0.1% durante la prueba de aversión. La disminución en el consumo de sacarina con respecto a la ingesta de agua con dicho sabor durante la sesión de adquisición fue usada como parámetro de la fuerza aversiva del CAS.

### **4.3. Inducción de la LTP en la CI**

Con el fin de inducir LTP en la CI, los animales fueron sometidos a cirugía estereotáxica. Para ello, las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital (50mg/kg i.p.), posteriormente se administraron inyecciones suplementarias del anestésico a intervalos de una hora con el fin de mantener los niveles quirúrgicos de anestesia. La temperatura del cuerpo fue mantenida a 35°C con un cojín homeotérmico. Las respuestas en la CI fueron registradas

unilateralmente con un electrodo monopolar de acero de 127 micrómetros de diámetro, colocado en las siguientes coordenadas: AP +1.2mm, ML 5.5 mm, DV -5.5mm (Paxinos et al., 1985). Las respuestas fueron evocadas unilateralmente a través de estimulación directa en el núcleo basolateral amigdalino, en las coordenadas: AP -2.8mm, ML -5.0mm, -8.5mm + ó - 0.2 (Paxinos et al., 1985), con un electrodo bipolar trenzado de acero de 127 micrómetros de diámetro. La estimulación (pulsos monofásicos de 50-70  $\mu$ A y 0.25 ms de duración) fue suministrada por un estimulador Grass S48 y aplicada al electrodo de estimulación a través de una unidad PSIU6. Las respuestas evocadas fueron enviadas a un amplificador Grass P5. Posteriormente la señal fue digitalizada para su almacenamiento y análisis en una computadora provista con el software Datawave SciWorks (Longmont, CO). Estímulos de baja frecuencia fueron evocados (cada 20 segundos, 0.05 Hz) durante los 20 minutos que constituyen la línea base. Posterior a la línea base, se aplicaron 10 trenes de estimulación con duración de un segundo cada uno, a una frecuencia de 100 Hz, con un intervalo intertrén de 20 segundos, con el fin de inducir la LTP. Tras la estimulación de alta frecuencia, las respuestas evocadas fueron registradas durante una hora más, con el fin de observar los cambios en la pendiente de los PPSEs.

#### **4.4. Curvas entrada-salida (I/O)**

Con el propósito de determinar la eficiencia sináptica para un rango determinado de intensidades de estimulación, se midió la relación entre la entrada de corriente y la salida de voltaje (I/O) en la vía Bla-CI utilizando múltiplos de una intensidad basal (1x-10x). La intensidad basal fue determinada como la estimulación necesaria para evocar una respuesta de 10 mV.

#### **4.5. Implantación de cánulas e infusión de sustancias en la CI**

El procedimiento quirúrgico en los sujetos se llevó a cabo utilizando técnicas estereotáxicas y consistió en la implantación bilateral de cánulas guía de acero inoxidable de un centímetro de largo, 0.635 mm de diámetro externo y 0.330 mm de diámetro interno. Las coordenadas empleadas fueron AP = +1.2 mm, ML =  $\pm$ 5.5 mm y DV = -3 mm (Paxinos et al., 1985). El extremo inferior de las cánulas fue colocado 3 mm por debajo del parénquima (2mm por encima de

la CI). Ambas cánulas fueron fijadas al cráneo utilizando acrílico dental de secado rápido. Un estilete de alambre de acero inoxidable fue introducido al interior de cada cánula con el fin de proteger su luz de obstrucciones durante el periodo previo a la infusión. El entrenamiento en el CAS comenzó al cabo de un período post operatorio de 7 días.

Una vez canulados, los grupos fueron infundidos intraparenquimalmente en la CI. Las infusiones bilaterales fueron realizadas con microinyectores contruidos con agujas dentales de calibre 30, los cuales fueron introducidos 2 mm por debajo de la posición de las cánulas, alcanzando la CI. Los microinyectores fueron conectados mediante mangueras de polietileno a jeringas Hamilton de 10  $\mu$ l. Las microinyecciones fueron dosificadas mediante una bomba de microinfusión (Carnegie Medicin, MA).

#### **4.6. Histoquímica de Nissl**

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

#### **4.7. Análisis de Datos**

El análisis de los datos generados durante los experimentos conductuales se efectuó a través del ANOVA factorial, en tanto el correspondiente a los experimentos electrofisiológicos empleó el ANOVA de medidas repetidas. En ambos casos se empleó la prueba post-hoc de Fisher.

## 5. DISEÑO EXPERIMENTAL

El presente proyecto fue dividido en las siguientes fases experimentales:

### 5.1. Fase 1

Con el fin de analizar la influencia del entrenamiento en el CAS sobre la subsecuente inducción de la LTP en la proyección Bla-CI, los animales fueron divididos de la siguiente forma:

- Grupo CAS+LTP48 (n=9), el cual fue entrenado en el CAS 48 horas previas a la inducción de LTP en la CI.
- Grupo pseudoCAS+LTP48 (n=7), el cual fue entrenado en el CAS 48 horas previas a la inducción de la LTP en ausencia del estímulo aversivo; en sustitución del cloruro de litio se administró una inyección de PBS (vehículo), evitando la asociación sabor-malestar gástrico.
- Grupo H<sub>2</sub>O+LTP48 (n=7), el cual fue entrenado en el CAS 48 horas previas a la inducción de la LTP en ausencia del sabor novedoso; en sustitución de la sacarina se le presentó agua, evitando la asociación sabor-malestar gástrico.
- Grupo LTP (n=9), el cual fue introducido directamente a la fase electrofisiológica sin previo entrenamiento en el CAS.

### 5.2. Fase 2

Asimismo, con el fin de analizar la influencia del entrenamiento en el CAS sobre la excitabilidad neuronal de la proyección Bla-CI, se midieron las curvas I/O de los PPSEs en dicha conexión. Los animales fueron divididos de la siguiente manera:

- Grupo CAS+IO (n=7), el cual fue entrenado en el CAS 48 horas previas a la medición de las curvas I/O.
- Grupo pseudoCAS+IO (n=7), el cual fue entrenado en el CAS 48 horas previas a la medición de las curvas IO en ausencia del estímulo aversivo; en sustitución del cloruro de litio se administró una inyección de PBS (vehículo), evitando la asociación sabor-malestar gástrico.

### 5.3. Fase 3

Posteriormente, se extendieron los tiempos entre el entrenamiento en el CAS y la inducción de LTP en la CI, con el fin de examinar el curso temporal del efecto producido por el CAS sobre la inducción subsecuente de LTP en la CI. Para este propósito, los animales fueron divididos de la siguiente forma:

- Grupos CAS+LTP72 (n=4), CAS+LTP796 (n=4) y CAS+LTP120 (n=5), los cuales fueron entrenados en el CAS 72, 96 y 120 horas, respectivamente, previas a la inducción de LTP en la CI.
- Grupos pseudoCAS+LTP72 (n=6), pseudoCAS+LTP96 (n=5), pseudoCAS+LTP120 (n=5), los cuales fueron entrenados en el CAS 72, 96 y 120 horas, respectivamente, previas a la inducción de la LTP en la CI en ausencia del estímulo aversivo; en sustitución del cloruro de litio se les administró una inyección de PBS (vehículo), evitando la asociación sabor-malestar gástrico.

### 5.4. Fase 4

Finalmente, nos propusimos caracterizar parte de los mecanismos responsables de la interacción del CAS con la LTP de la CI. Con este fin, infundimos intracorticalmente diferentes fármacos que inhiben la formación del CAS para analizar su influencia en el efecto del CAS sobre la posibilidad de inducir LTP en la CI. Los animales fueron divididos de la siguiente forma:

- Grupo CPP (n=9), el cual fue entrenado en el CAS e infundido 30 minutos antes de la presentación de sacarina con el antagonista competitivo para los receptores NMDA, CPP (Tocris, Ellisville, MO; 0.05  $\mu$ M; 0.5  $\mu$ l x hemisferio [10  $\mu$ g/1  $\mu$ l]; 0.5  $\mu$ l/min) bilateralmente en la CI (Escobar et al., 2002). La estimulación necesaria para inducir LTP en la CI fue aplicada 48 horas después del entrenamiento en el CAS.
- Grupo VEHCPP (n=6), el cual fue entrenado en el CAS e infundido 30 minutos antes de la presentación de sacarina con buffer de fosfatos como vehículo (PBS; 0.5  $\mu$ l x hemisferio; 0.5  $\mu$ l/min) bilateralmente en la CI (Escobar et al., 2002). La estimulación necesaria para inducir LTP en la CI fue aplicada 48 horas después del entrenamiento en el CAS.

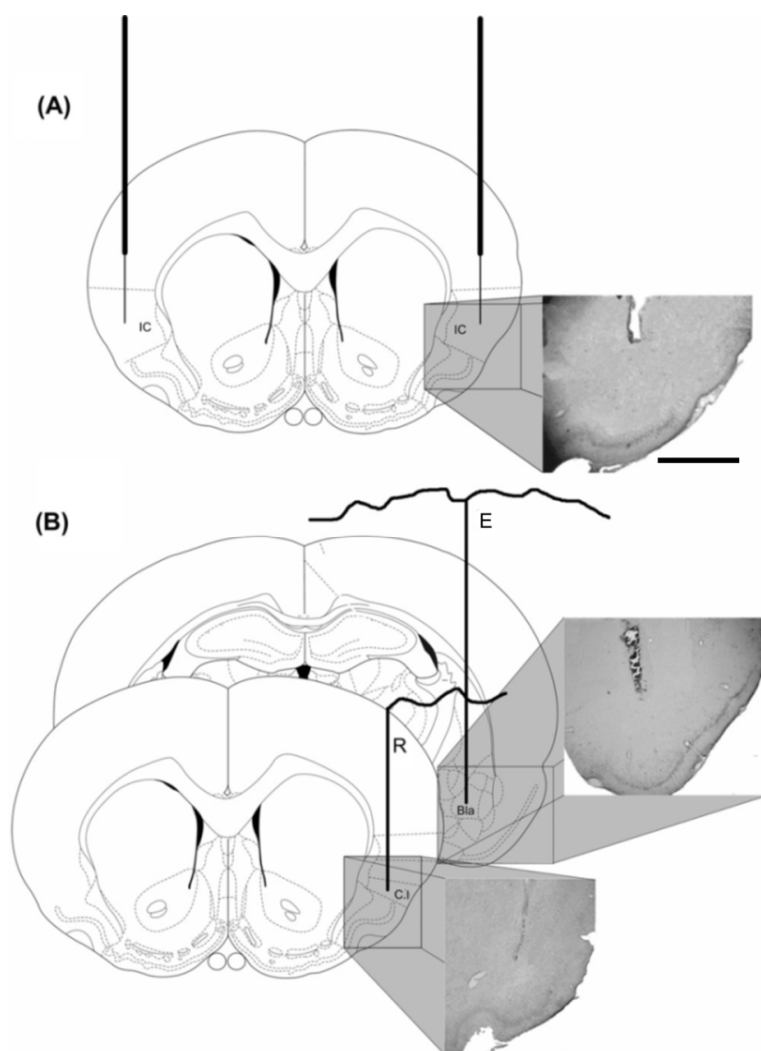


- Grupo CHE (n=7), el cual fue entrenado en el CAS, e infundido 20 minutos después de la inyección de LiCl con el inhibidor selectivo de la PKC queleritrina (Alomone Labs, Jerusalem, Israel; 2.6 mM; 0.5  $\mu$ l x hemisferio [1  $\mu$ g/1  $\mu$ l]; 0.5  $\mu$ l/min) bilateralmente en la CI (Nunez-Jaramillo et al., 2007). La estimulación necesaria para inducir LTP en la CI fue aplicada 48 horas después del entrenamiento en el CAS.
- Grupo VehCH (n=8), el cual fue entrenado en el CAS e infundido 20 minutos antes de la presentación de sacarina con PBS (0.5  $\mu$ l x hemisferio; 0.5  $\mu$ l/min) bilateralmente en la CI (Nunez-Jaramillo et al., 2007). La estimulación necesaria para inducir LTP en la CI fue aplicada 48 horas después del entrenamiento en el CAS.
- Grupo KT (n=8), el cual fue entrenado en el CAS e infundido 20 minutos después de la inyección de LiCl con KT5720 (Alomone Labs, Jerusalem, Israel; 1.86 mM; 0.5  $\mu$ l x hemisferio [1  $\mu$ g/1  $\mu$ l]; 0.5  $\mu$ l/min) bilateralmente en la CI (Koh et al., 2002). La estimulación necesaria para inducir LTP en la CI fue aplicada 48 horas después del entrenamiento en el CAS.
- Grupo VehKT (n=9), el cual fue entrenado en el CAS e infundido 20 minutos antes de la presentación de sacarina con PBS (0.5  $\mu$ l x hemisferio; 0.5  $\mu$ l/min) bilateralmente en la CI (Koh et al., 2002). La estimulación necesaria para inducir LTP en la CI fue aplicada 48 horas después del entrenamiento en el CAS.
- Grupo ANI (n=9), el cual fue entrenado en el CAS e infundido 20 minutos antes de la presentación de sacarina con anisomisina (Tocris, Ellisville, MO; 0.37 M; 1  $\mu$ l por hemisferio [100 mg/ml]; 1  $\mu$ l/min) bilateralmente en la CI (Moguel-Gonzalez et al., 2008). La estimulación necesaria para inducir LTP en la CI fue aplicada 48 horas después del entrenamiento en el CAS.
- Grupo ACSF (n=8), el cual fue entrenado en el CAS e infundido 20 minutos antes de la presentación de sacarina con líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF; 1  $\mu$ l x hemisferio; 1  $\mu$ l/min) bilateralmente en la CI (Moguel-Gonzalez et al., 2008). La estimulación necesaria para inducir LTP en la CI fue aplicada 48 horas después del entrenamiento en el CAS.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Resultados histológicos

Los datos histológicos mostraron que el electrodo de estimulación y el de registro estuvieron correctamente colocados en el Bla y en la CI respectivamente en todas las ratas que fueron sometidas a la fase electrofisiológica (figura 10B). Asimismo, la figura 10A muestra la adecuada posición de los microinyectores en la CI. Los animales con cánulas y electrodos que no presentaron una posición adecuada fueron excluidos del análisis experimental.

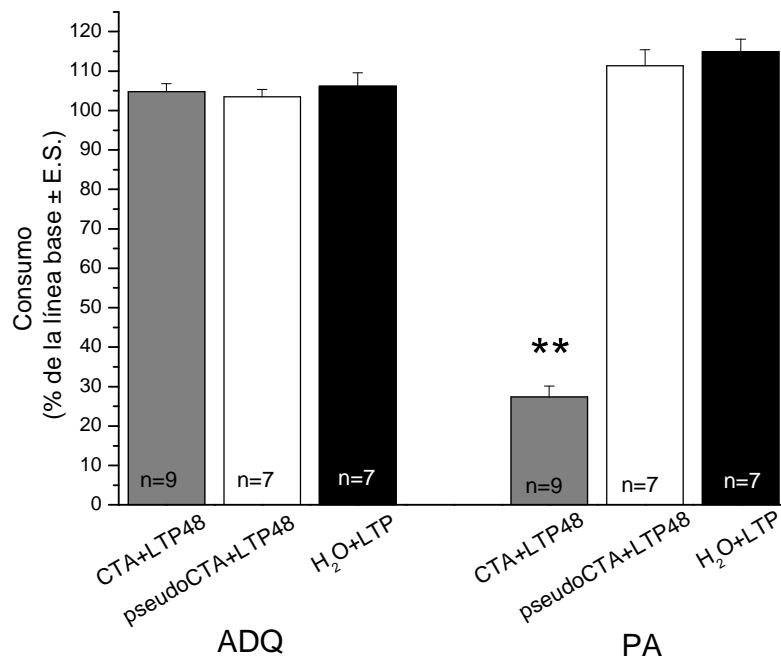


**Figura 10. Ubicación de las cánulas y los electrodos en la proyección Bla-CI. A)** Representación esquemática de la ubicación de las cánulas en la CI, mostrando sección coronal donde se observa la correcta colocación de las cánulas en la CI. **B)** Representación esquemática de la ubicación de los electrodos en el Bla (electrodo de estimulación, E) y en la CI (electrodo de registro, R), mostrando secciones coronales donde se observa la correcta colocación de los electrodos en la CI y en el Bla. Barra de escala: 1 mm.

## 6.2. Resultados fase 1: el entrenamiento en el CAS modifica la inducción subsecuente de LTP en la CI en ratas adultas *in vivo*

### 6.2.1 Resultados conductuales

Durante la línea base de consumo de agua no se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos CAS+LTP48, pseudoCAS+LTP48 y H<sub>2</sub>O+LTP. Tampoco observamos diferencias significativas durante el consumo de la solución de sacarina durante la sesión de adquisición entre los mencionados grupos (figura 11). El promedio de consumo de agua durante la línea base fue de  $16.22 \pm 0.97$ ,  $16.43 \pm 1.27$  y  $16.29 \pm 0.76$  para los grupos CAS+LTP48, pseudoCAS+LTP48 y H<sub>2</sub>O+LTP, respectivamente. El ANOVA factorial comparando el consumo de sacarina en la prueba de aversión mostró diferencias significativas entre los tres grupos mencionados ( $F_{2,20} = 240.23$ ). El análisis post-hoc empleando la prueba de Fisher mostró que el grupo CAS+LTP48 presentó diferencias significativas con respecto a los grupos pseudoCAS+LTP48 y H<sub>2</sub>O+LTP ( $p < 0.001$ ) durante la prueba de aversión. Únicamente el grupo en el cual se asoció el estímulo gustativo y el aversivo presentó aversión al sabor (figura 11).

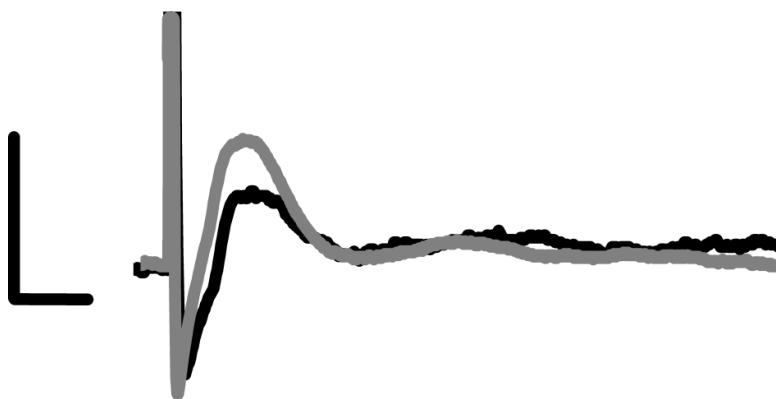


**Figura 11. Consumo de sacarina durante el CAS para la fase 1.** Consumo de sacarina en mililitros (media ± E.S.) durante la sesión de adquisición (ADQ) y la prueba de aversión (PA). \*\*  $p < 0.01$ .

### 6.2.2. Resultados electrofisiológicos

En este estudio se muestra que, en concordancia con previos reportes (Escobar et al., 1998a), diez trenes de estimulación con duración de un segundo cada uno a una frecuencia de 100 Hz, induce LTP en la vía de comunicación que va del núcleo basolateral amigdalino hacia la CI de ratas adultas *in vivo*.

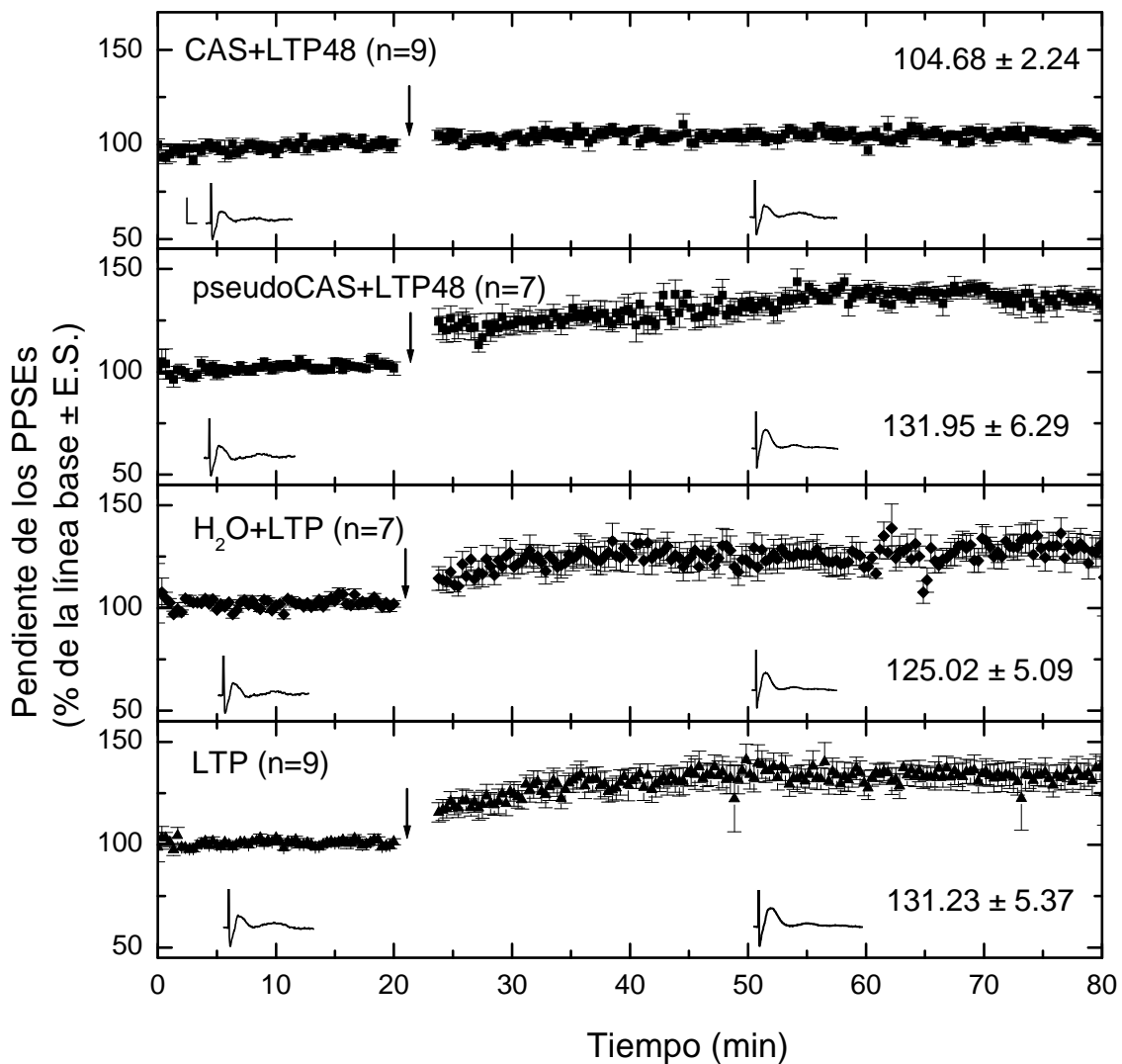
La respuesta característica de esta señal, la cual fue inducida por pulsos monofásicos de 50-70  $\mu\text{A}$  y 0.25 ms de duración, inició de 2 a 3 ms y presentó su cresta a los 7-9 ms aproximadamente. La amplitud promedio de dichos potenciales de campo fue de  $0.29 \pm 0.31$  mV, con una pendiente de  $0.075 \pm 0.22$ . La LTP presentó un incremento post-tetánico, característico de la LTP dependiente del receptor NMDA, tanto en la amplitud como en la pendiente de los PPSEs (figura 12).



**Figura 12. PPSEs en la CI.** Los trazos muestran ejemplos de los PPSEs tomados 10 minutos antes (negro) y 60 minutos después (gris) de la inducción de los trenes de alta frecuencia en la vía Bla-CI (escala: 10 ms, 0.5 mV).

Nuestros resultados muestran que el entrenamiento en el CAS modifica la posibilidad de inducir plasticidad sináptica subsecuente en la vía Bla-CI en ratas adultas *in vivo*. El grupo CAS+LTP48 no expresó la LTP en la CI, a diferencia de los grupos pseudoCAS+LTP, H<sub>2</sub>O+LTP y LTP, los cuales presentaron incrementos en la eficiencia sináptica después de la inducción de la estimulación de alta frecuencia (figura 13). El ANOVA de medidas repetidas comparando las pendientes de los PPSEs después de la inducción de la alta frecuencia mostró diferencias significativas entre los cuatro grupos mencionados ( $F_{3,28} = 16.80$ ). El análisis post-hoc empleando la prueba de

Fisher mostró que los grupos pseudo-CAS+LTP48, H<sub>2</sub>O+LTP y LTP, los cuales sí presentaron potenciación a largo plazo, no mostraron diferencias significativas entre ellos. Sin embargo, todos y cada uno de los grupos mencionados anteriormente presentó diferencias significativas ( $p < .0001$ ) con respecto a los grupos CAS+LTP48 (figura 13). Estos resultados nos indican que el entrenamiento en el CAS inhibe la subsecuente inducción de LTP en la CI y que dicha inhibición no es observada cuando se presenta sólo el estímulo condicionado o el incondicionado.



**Figura 13. El entrenamiento en el CAS modifica la posibilidad de inducir LTP en la CI.** Gráficas donde se representa la media ( $\pm$  E.S.) del porcentaje de la pendiente de los PPSEs con respecto a la línea base (100%) para cada grupo. La flecha representa la estimulación de alta frecuencia (10 trenes de 100 Hz/1s/20s intertrén). Los trazos muestran ejemplos representativos de los PPSEs tomados 10 minutos antes y 60 minutos después de la estimulación de alta frecuencia. Los números al interior de cada gráfica representan la media ( $\pm$  E.S.) de la pendiente de los PPSEs después de la estimulación de alta frecuencia para cada grupo. Escala: 0.4 mV, 9 ms.

### 6.3. Resultados fase 2: el entrenamiento en el CAS incrementa la excitabilidad de las neuronas de la proyección Bla-CI

#### 6.3.1. Resultados conductuales

Durante la línea base de consumo de agua no se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos CAS+IO y pseudoCAS+IO. Tampoco observamos diferencias significativas durante el consumo de sacarina durante la sesión de adquisición entre los mencionados grupos (figura 14). El promedio de consumo de agua durante la línea base fue de  $16.87 \pm 1.51$  y  $18.94 \pm 1.65$  para los grupos CAS+IO y pseudoCAS+IO, respectivamente. El ANOVA factorial comparando el consumo de sacarina en la prueba de aversión mostró diferencias significativas entre los dos grupos mencionados ( $F_{1,12} = 533.23$ ). Únicamente el grupo al cual se le asoció el estímulo gustativo y el aversivo presentó aversión al sabor (figura 14).

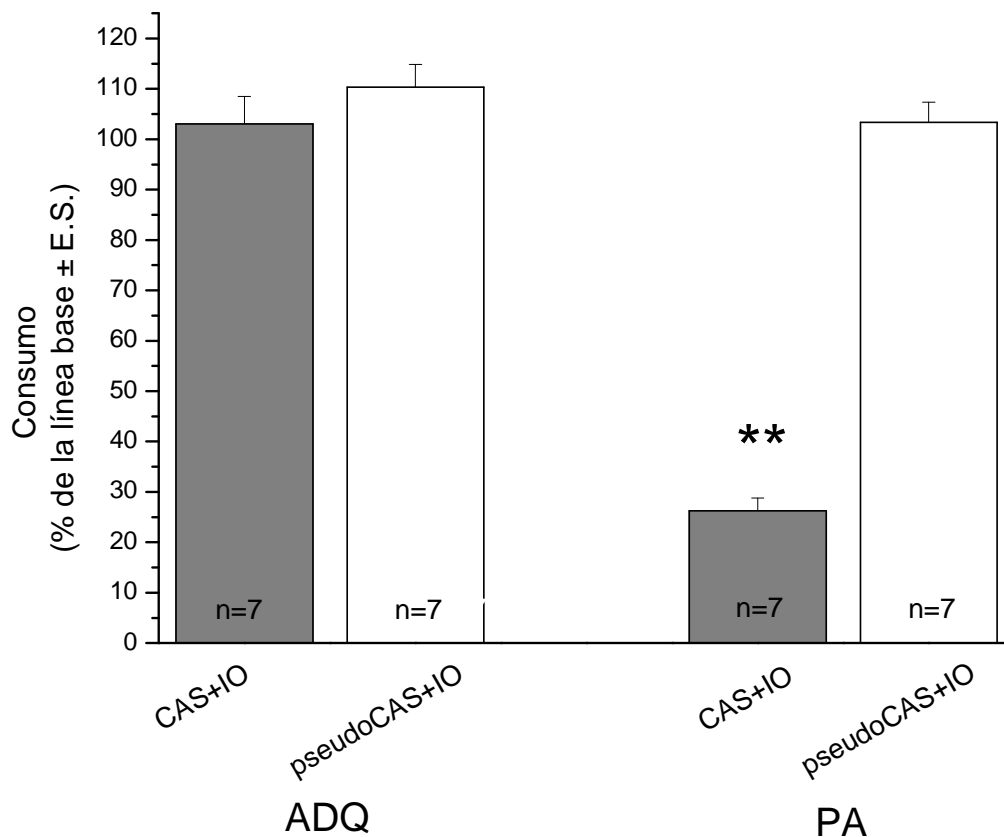
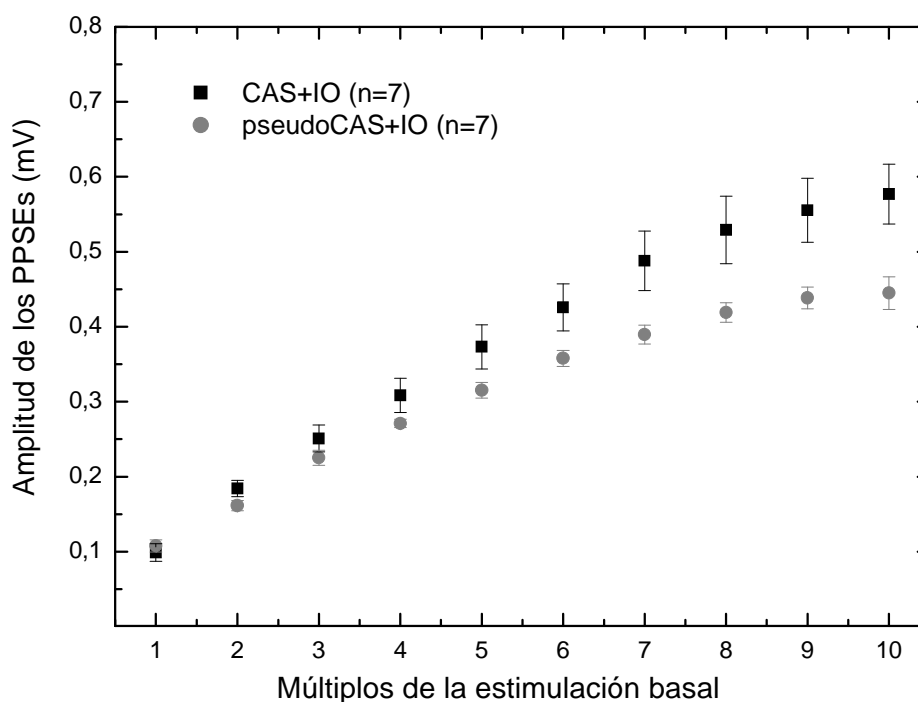


Figura 14. Consumo de sacarina durante el CAS para la fase 2. Consumo de sacarina en mililitros (media ± E.S.) durante la sesión de adquisición (ADQ) y la prueba de aversión (PA). \*\*  $p < 0.01$ .

### 6.3.2. Resultados electrofisiológicos

Asimismo, encontramos que el entrenamiento en el CAS incrementa la excitabilidad de la conexión neuronal Bla-CI. El análisis de regresión no lineal de las curvas I/O reveló diferencias significativas cuando se comparó al grupo CAS+IO con el grupo pseudoCAS+IO ( $p < 0.001$ ). Esta evidencia sugiere que el CAS produce un incremento en la eficiencia sináptica de la vía Bla-CI, lo cual modifica la excitabilidad de la vía (figura 15).

### 6.4. Resultados fase 3: persistencia del efecto del CAS sobre la inducción de LTP en la CI

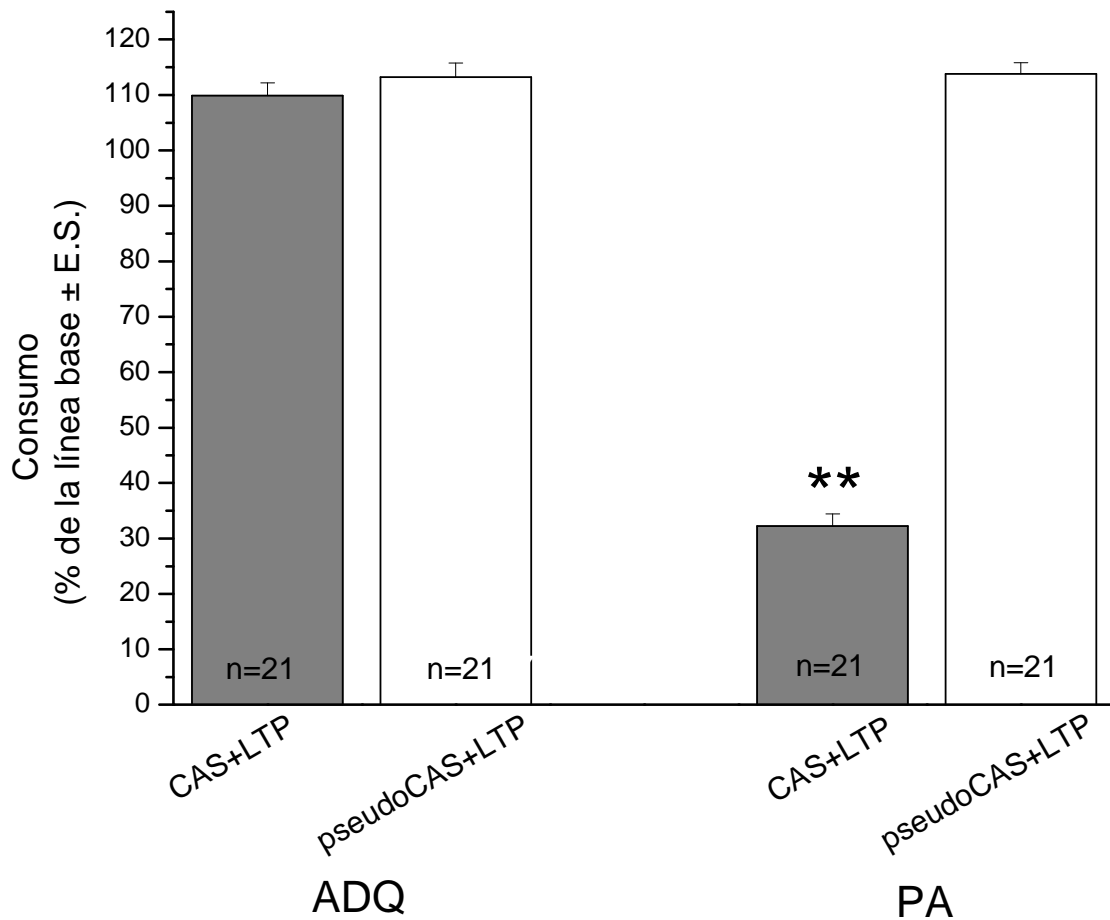


**Figura 15.** El CAS modifica la excitabilidad de la proyección Bla-CI. La gráfica representa la media ( $\pm$  E.S.) de las curvas I/O para los grupos CAS+IO y pseudoCAS+IO. Para construir la curva fueron utilizados múltiplos (1-10) de la intensidad basal, la cual fue determinada como la estimulación necesaria para evocar una respuesta de 0.10 mV.

### 6.4.1. Resultados conductuales

Durante la línea base de consumo de agua no se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos CAS+LTP72, CAS+LTP96, CAS+LTP120, pseudoCAS+LTP72, pseudoCAS+LTP96 y pseudoCAS+LTP120. Tampoco observamos diferencias significativas durante el consumo de sacarina durante la sesión de adquisición entre los mencionados grupos (figura 16). El promedio

de consumo de agua durante la línea base fue de  $15.95 \pm 1.11$  y  $15.86 \pm 0.85$  para los grupos CAS+LTP y pseudoCAS+LTP, respectivamente. El ANOVA factorial comparando el consumo de sacarina en la prueba de aversión mostró diferencias significativas entre los seis grupos mencionados ( $F_{5,36} = 118.56$ ). El análisis post-hoc empleando la prueba de Fisher reveló que los grupos CAS+LTP72, CAS+LTP96 y CAS+LTP120 presentan diferencias significativas con respecto a los grupos pseudoCAS+LTP72, pseudoCAS+LTP96 y pseudoCAS+LTP120 ( $p < .001$ ) durante la prueba de aversión. Únicamente los grupos a los cuales se le asoció el estímulo gustativo y el aversivo presentaron aversión al sabor (figura 16).

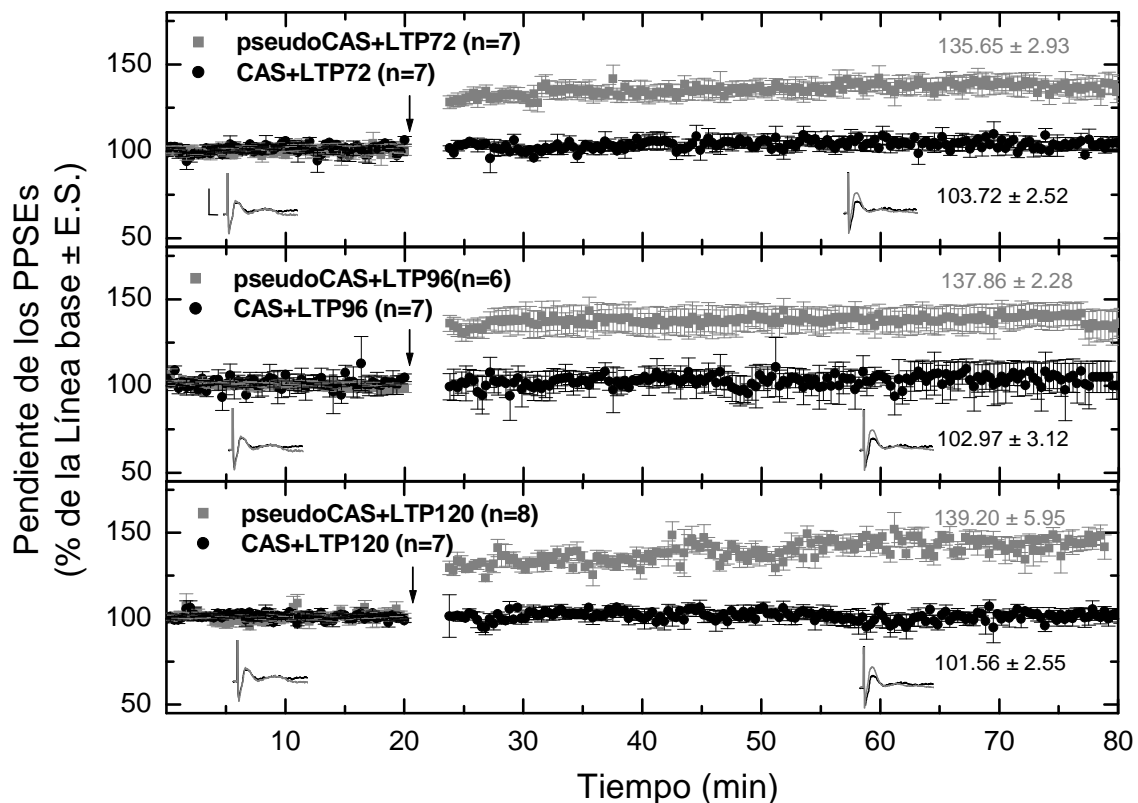


**Figura 16. Consumo de sacarina durante el CAS para la fase 3.** Consumo de sacarina en mililitros (media ± E.S.) durante la sesión de adquisición (ADQ) y la prueba de aversión (PA). Los grupos CAS+LTP por un lado y los grupos pseudoCAS+LTP fueron graficados juntos debido a que no se encontraron diferencias significativas entre ellos. \*\*  $p < 0.01$ .



#### 6.4.2. Resultados electrofisiológicos

Nuestros resultados muestran que los grupos CAS+LTP72, 96 y 120 no expresaron la LTP en la CI, a diferencia de los grupos pseudoCAS+LTP72, 96 y 120, los cuales presentaron incrementos en la eficiencia sináptica después de la inducción de la estimulación de alta frecuencia (figura 17). El ANOVA de medidas repetidas comparando las pendientes de los PPSEs después de la inducción de la alta frecuencia mostró diferencias significativas entre los seis grupos mencionados ( $F_{5,36} = 18.56$ ). El análisis post-hoc empleando la prueba de Fisher mostró que los grupos CAS+LTP72, 96 y 120, presentaron diferencias significativas con respecto a los grupos pseudoCAS+LTP72, 96 y 120 ( $p < .001$ ). Es importante mencionar que no se encontraron diferencias significativas entre los grupos CAS+LTP48, 72, 96 y 120, lo cual señala que el efecto del CAS sobre la posibilidad de inducir LTP subsecuente persiste sin modificación al menos durante 5 días después del entrenamiento (figura 17).

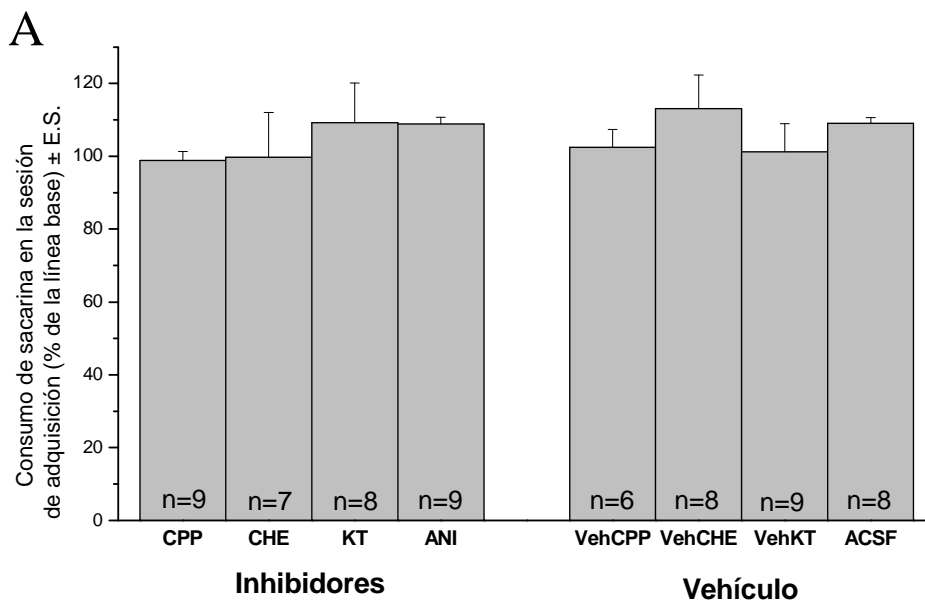


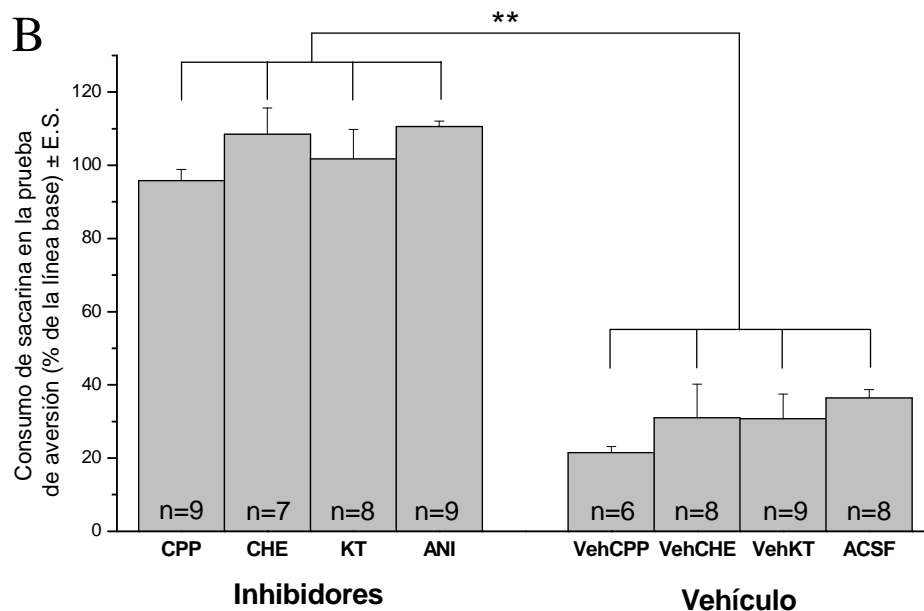
**Figura 17. El entrenamiento en el CAS modifica la posibilidad de inducir LTP en la CI al menos 5 días posteriores al entrenamiento.** Graficas donde se representa la media ( $\pm$  E.S.) del porcentaje de la pendiente de los PPSEs con respecto a la línea base (100%) para cada grupo. La flecha representa la estimulación de alta frecuencia (10 trenes de 100 Hz/1s/20s intertrén). Los trazos muestran ejemplos de los PPSEs tomados 10 minutos antes y 60 minutos después de la estimulación de alta frecuencia. Los números en el interior de cada grafica representan la media ( $\pm$  E.S.) de la pendiente de los PPSEs después de la estimulación de alta frecuencia para cada grupo. Escala: 0.4 mV, 9 ms.

## 6.5. Resultados fase 4: mecanismos moleculares responsables de la interacción CAS-LTP en la CI

### 6.5.1 Resultados conductuales

Durante la línea base de consumo de agua no se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos CPP, VehCPP, CHE, VehCHE, KT, VehKT, ANI y ACSF. Tampoco observamos diferencias significativas durante el consumo de sacarina durante la sesión de adquisición entre los mencionados grupos (figura 18A). El promedio de consumo de agua durante la línea base fue de  $16.55 \pm 0.61$ ,  $17.86 \pm 1.85$ ,  $15.67 \pm 1.57$ ,  $18.24 \pm 0.88$ ,  $16.41 \pm 0.69$ ,  $16.24 \pm 0.47$ ,  $17.25 \pm 0.52$  y  $16.11 \pm 1.22$  para los grupos CPP, VehCPP, CHE, VehCHE, KT, VehKT, ANI y ACSF, respectivamente. El ANOVA factorial comparando el consumo de sacarina en la prueba de aversión mostró diferencias significativas entre los seis grupos mencionados ( $F_{7,62} = 521.89$ ; figura 18B). El análisis post-hoc empleando la prueba de Fisher reveló que los grupos CPP, CHE, KT y ANI presentaron diferencias significativas con respecto a los grupos VehCPP, VehCHE, VehKT y ACSF ( $p < .001$ ) durante la prueba de aversión. Únicamente aquellos grupos a los cuales se les infundió la solución vehículo en sustitución del fármaco bloqueador del CAS presentaron aversión al sabor (figura 18).

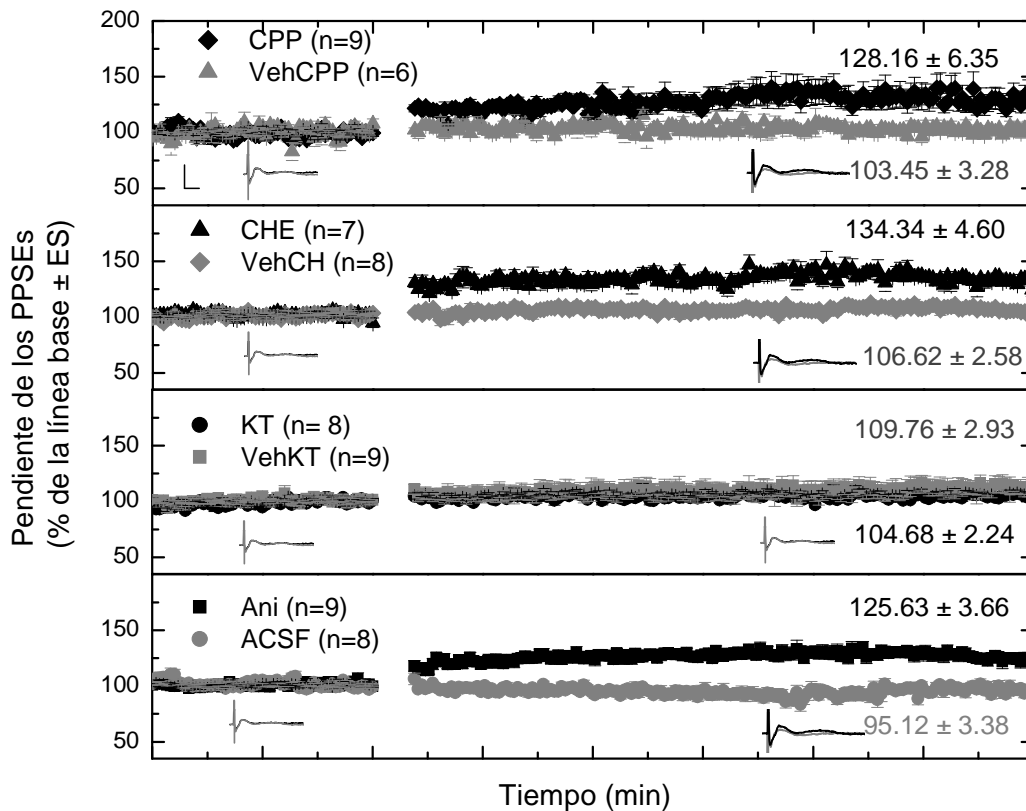




**Figura 18. Inhibición del CAS.** La gráfica muestra el consumo de sacarina (porcentaje de la línea base; media ± E.S.) durante la sesión de adquisición (A) y la prueba de aversión. (B) de los grupos que fueron infundidos con fármacos inhibidores del CAS y aquellos a los cuales solo se les infundió el vehículo. Sólo aquellos grupos a los cuales se les infundió el vehículo en sustitución del fármaco inhibidor presentaron aversión al sabor.

### 6.5.2 Resultados electrofisiológicos

Nuestros resultados muestran que los grupos VehCPP, VehCHE, VehKT, ACSF y KT no expresaron LTP en la vía Bla-CI, a diferencia de los grupos CPP, CHE y ANI, los cuales presentaron incrementos en la eficiencia sináptica tras la estimulación de alta frecuencia (figura 19). El ANOVA de medidas repetidas comparando las pendientes de los PPSEs después de la inducción de la alta frecuencia mostró diferencias significativas entre los seis grupos mencionados ( $F_{(5,59)}=17.58$ ). El análisis post-hoc empleando la prueba de Fisher mostró que los grupos CPP, CHE y ANI, presentaron diferencias significativas con respecto a los grupos VehCPP, VehCHE, ACSF ( $p<.001$ ), mostrando que el efecto del CAS sobre la inducción de la LTP en la CI es inhibido cuando el CAS es bloqueado farmacológicamente con el antagonista para el receptor NMDA, con el inhibidor de la PKC y con el inhibidor de la síntesis de proteínas (figura 19).



**Figura 19. Mecanismos que subyacen al efecto que produce el CAS sobre la expresión subsecuente de LTP en la CI.** Gráficas donde se representa la media ( $\pm$  E.S.) del porcentaje de la pendiente de los PPSEs con respecto a la línea base (100%) para cada grupo. La flecha representa la estimulación de alta frecuencia (10 trenes de 100 Hz/1s/20s intertrén). Los trazos muestran ejemplos representativos de los PPSEs tomados 10 minutos antes y 60 minutos después de la estimulación de alta frecuencia. Los números al interior de cada gráfica representan la media ( $\pm$  E.S.) de la pendiente de los PPSEs después de la estimulación de alta frecuencia para cada grupo. Escala: 0.4 mV, 9 ms.

Sin embargo, la inhibición de la PKA inhibe el CAS, pero no modifica el efecto del CAS sobre la LTP en la CI. El análisis post-hoc empleando la prueba de Fisher no mostró diferencias significativas cuando se comparó al grupo KT con el grupo VehKT (figura 19). Estos resultados muestran que la modificación en la habilidad de inducir LTP en la CI debido al entrenamiento en el CAS comparte ciertos mecanismos con el mismo condicionamiento, pero difiere en la participación de determinadas proteínas.

## 7. DISCUSIÓN

El aprendizaje y la memoria son dos procesos que implican la adaptación de los circuitos neuronales al medio ambiente y desde la perspectiva de las neurociencias el estudio de dichos fenómenos se ha enfocado al análisis de los mecanismos que subyacen al almacenamiento de información en el SN. En este sentido se han utilizado métodos electrofisiológicos que han mostrado cambios en la actividad eléctrica neuronal durante los procesos relacionados con el almacenamiento de información (Tagamets & Horwitz, 2000; Abraham, 2008; Citri & Malenka, 2008). Asimismo, se ha descrito que dichos cambios plásticos iniciados por el aprendizaje de tareas conductuales se encuentran distribuidos dependiendo de la modalidad sensorial y el tipo de información que se esté almacenando (Lynch, 2004; Besle et al., 2009). Como se mencionó en líneas anteriores, existen coincidencias de mecanismos celulares entre los cambios provocados por la memoria y fenómenos plásticos como la LTP o la LTD (Malenka & Bear, 2004; Citri & Malenka, 2008). Se ha observado incluso que ciertas tareas conductuales modifican la eficiencia sináptica (McKernan & Shinnick-Gallagher, 1997; Rogan et al., 1997; Rioult-Pedotti et al., 2000; Monfils & Teskey, 2004; Whitlock et al., 2006) además de producir cambios en la posibilidad de inducir subsecuente plasticidad sináptica (Rioult-Pedotti et al., 2000; Quinlan et al., 2004; Schroeder & Shinnick-Gallagher, 2005; Hirata et al., 2009; Rudy & Matus-Amat, 2009). En el presente estudio mostramos que el CAS modula la inducción de la LTP en la CI, un área neocortical que es considerada como el relevo final de la vía gustativa y que se ha visto involucrada en el almacenamiento de memorias aversivas.

### 7.1. El CAS modifica la habilidad de inducir LTP en la CI

Como se mencionó en líneas anteriores, el CAS es un entrenamiento conductual en el cual se asocia un estímulo gustativo con una irritación gástrica. Dicha asociación promueve modificaciones plásticas en la CI, como cambios en la actividad del gen de expresión temprana c-fos (Bernstein & Koh, 2007) o cambios en la distribución de los mapas sensoriales de la corteza gustativa en ratas (Accolla & Carleton, 2008), mostrando que el entrenamiento

en el CAS modula las propiedades de las neuronas en la CI. En concordancia con lo anterior, nuestros resultados muestran que el entrenamiento en el CAS previene la inducción subsecuente de LTP en la CI. En estudios previos de nuestro laboratorio, se mostró que la inducción de LTP en la CI previa al entrenamiento en el CAS aumenta la retención de este condicionamiento (Escobar et al., 2002) y ambos resultados sugieren una coincidencia entre los mecanismos que subyacen al CAS y a la LTP de la CI.

Los resultados aquí presentados son consistentes con los mostrados por Rioult-Pedotti en 2000 y Quinlan et al. en 2004, quienes observaron modificaciones en la LTP neocortical (corteza motora y olfativa, respectivamente) debidas al entrenamiento previo en una tarea conductual (Rioult-Pedotti et al., 2000; Quinlan et al., 2004). Las dos investigaciones mencionadas junto con la nuestra muestran que existe una estrecha relación entre la conducta y la expresión de LTP localizada en diferentes áreas neocorticales. Asimismo, nuestros resultados ponen de manifiesto la importancia que tiene la proyección Bla-CI para el procesamiento del CAS.

Actualmente se considera que el estímulo gustativo activa la vía gustativa hasta su relevo final en la CI, mientras que el aversivo activa a la corteza insular a través de la vía amígdalo-cortical (Bermúdez-Rattoni, 2004; Bermúdez-Rattoni et al., 2005). A este respecto se ha demostrado que la inactivación de la amígdala poco antes de la presentación del estímulo gustativo no afecta el CAS, mientras que la inactivación de esta estructura después de la presentación del estímulo gustativo o antes de la presentación del estímulo aversivo impide la inducción de dicho condicionamiento (Gallo et al., 1992). Asimismo, se ha observado que el entrenamiento en el CAS origina incrementos en la actividad glutamatérgica de la amígdala y la corteza insular (Miranda et al., 2002; Guzman-Ramos et al., 2010). Aunado a esto, el entrenamiento en el CAS modula las respuestas gustativas tanto en la amígdala como en la CI (Accolla & Carleton, 2008; Grossman et al., 2008). Nuestros resultados muestran que la proyección Bla-CI, estrechamente relacionada con la asociación de estímulos gustativos y aversivos, es modificada durante la formación del CAS y esto produce un cambio en el umbral para la inducción de LTP. Es importante notar que dicho cambio metaplástico no es observado cuando se presentan los estímulos condicionado

e incondicionado por separado, lo cual subraya que se encuentra asociado al trazo de memoria del CAS.

## **7.2. El CAS produce un incremento en la excitabilidad neuronal en la vía Bla-CI**

El entrenamiento en tareas conductuales puede promover un incremento en la eficiencia sináptica reflejado en una facilitación en la excitabilidad de las neuronas (McKernan & Shinnick-Gallagher, 1997; Rogan et al., 1997; Rioult-Pedotti et al., 1998; Cooke & Bear, 2010). Dicha facilitación puede ser observada a través de un aumento en las curvas I/O (Rioult-Pedotti et al., 2000; Schroeder & Shinnick-Gallagher, 2005; Hong et al., 2011), lo cual pone de manifiesto que la vía neuronal responde de una manera más efectiva a una estimulación determinada. Asimismo, se ha observado que una modificación en la eficiencia sináptica iniciada por el entrenamiento en tareas conductuales modifica la habilidad de inducir subsecuente plasticidad sináptica (Rioult-Pedotti et al., 2000; Schroeder & Shinnick-Gallagher, 2005; Cooke & Bear, 2010). Nuestra investigación revela que el CAS promueve un incremento en las curvas I/O, lo cual sugiere que dicho condicionamiento induce *per se* un incremento en la eficiencia sináptica de la proyección Bla-CI que se relaciona con el cambio en la posibilidad de inducir subsecuente LTP en la CI.

## **7.3. Persistencia del efecto producido por el CAS sobre la LTP en la CI**

Se ha propuesto que la permanencia de la memoria se traduce en cambios persistentes de las propiedades de las neuronas involucradas en el procesamiento de un tipo particular de memoria (Malenka & Bear, 2004). En la presente investigación mostramos que el efecto producido por el CAS sobre la LTP se mantiene durante por lo menos 120 horas después de concluida la fase conductual. Este resultado es consistente con el estudio de Schroeder y Shinnick-Gallagher en 2005, en el que el condicionamiento al miedo bloqueó la inducción subsecuente de LTP en la amígdala lateral hasta por diez días (Schroeder & Shinnick-Gallagher, 2005). Ambos resultados muestran cambios metaplásticos de larga duración producidos por el entrenamiento en una tarea conductual. Los cambios plásticos originados por la conducta no dependen únicamente de las propiedades biofísicas de las neuronas de manera

individual. Actualmente se considera que el mantenimiento de los cambios plásticos *in vivo* requiere de la coordinación de las diferentes células que conforman la red neuronal que está sujeta a modificaciones plásticas (Turrigiano, 2008; Turrigiano, 2011), produciendo así una mayor persistencia de tales modificaciones. Por otro lado, no está del todo esclarecido si los cambios metaplásticos inducidos por la conducta son reversibles. Recientemente se reportó que el condicionamiento al miedo induce un incremento en la eficiencia sináptica de la vía tálamo-amígdala lateral (Hong et al., 2011). Dicho incremento se encuentra relacionado con un bloqueo de la inducción subsecuente de LTP en la misma vía. De manera interesante, la extinción del condicionamiento al miedo revierte el incremento en la eficiencia sináptica así como el efecto de dicho condicionamiento sobre la inducción de LTP. Lo anterior sugiere que las modificaciones conductuales relacionadas con las tareas de aprendizaje se acompañan tanto de cambios en la eficiencia sináptica como de cambios metaplásticos reversibles (Hong et al., 2011).

#### **7.4. Mecanismos moleculares**

Como se ha mencionado, diferentes tareas conductuales modifican la posibilidad de inducir LTP (Rioult-Pedotti et al., 2000; Quinlan et al., 2004; Clem et al., 2008). Sin embargo, no está del todo esclarecido si la formación de la memoria comparte los mismos mecanismos moleculares que los cambios metaplásticos. Como se mencionó en líneas anteriores, se ha demostrado que el entrenamiento en el CAS modifica la posibilidad de inducir LTP en la CI y la inducción de LTP en dicha proyección modifica la retención del CAS, lo cual sugiere que los dos fenómenos utilizan comparten mecanismos moleculares en común para ejercer sus acciones (Escobar & Bermudez-Rattoni, 2000). El efecto metaplástico descrito en la presente investigación sugiere que el CAS modifica el umbral  $\theta_m$  en la vía Bla-CI de manera que en el presente estudio exploramos también parte de los mecanismos moleculares implicados en la interacción del CAS con la LTP de la CI. Observamos que el bloqueo farmacológico del CAS inhibe, el efecto de dicho condicionamiento sobre la inducción de LTP en la vía Bla-CI.



#### **7.4.1. Receptores NMDA**

Actualmente los receptores NMDA son considerados como unos de los principales responsables de la inducción de diversos fenómenos plásticos, debido a determinadas características como su permeabilidad al calcio y su capacidad de censar la actividad repetitiva (Voglis & Tavernarakis, 2006; Citri & Malenka, 2008). Se ha reportado que los receptores NMDA se encuentran involucrados en la inducción de diversas expresiones de plasticidad sináptica como la LTP y la LTD (Malenka & Bear, 2004; MacDonald et al., 2006; Citri & Malenka, 2008; Molnar, 2011). Además, éstos receptores también se encuentran relacionados con la memoria de diversas tareas de aprendizaje, incluyendo el CAS (Escobar et al., 1998a; Bermúdez-Rattoni, 2004).

Asimismo, se ha encontrado que el receptor NMDA también juega un papel crucial en las diferentes expresiones de plasticidad homeostática como el escalamiento sináptico o la metaplasticidad. Incluso se ha reportado que la conducta promueve cambios metaplásticos que dependen de los receptores NMDA (Quinlan et al., 2004; Schroeder & Shinnick-Gallagher, 2004; Rebola et al., 2011). Nuestros resultados muestran que la inhibición farmacológica de los receptores NMDA bloquea la inducción del CAS revirtiendo además la modulación metaplástica sobre la proyección Bla-CI inducida por dicho condicionamiento. Nuestros resultados sugieren que éste receptor es indispensable para la inducción del fenómeno metaplastico en la CI.

#### **7.4.2. Proteína cinasa C (PKC)**

De manera similar, nuestros resultados revelan que la inhibición de la PKC bloquea la consolidación del CAS y también evita los afectos del CAS sobre la subsecuente inducción de LTP en la CI. La PKC es una familia de proteínas cinasas activada por fosfolípidos, diacilglicerol, ácido araquidónico y calcio, por lo cual su activación depende de la actividad neuronal (Sacchetti & Bielavska, 1998). Además, ésta cinasa es considerada como esencial para diversas actividades celulares como el crecimiento celular, diversas expresiones de plasticidad sináptica como la LTP y la adquisición de diferentes conductas incluido el CAS (Bortolotto & Collingridge, 2000; Van der Zee et al., 2004; Nunez-Jaramillo et al., 2007). La presente investigación muestra que la inhibición de ésta cinasa bloquea el efecto metaplástico inducido por el

entrenamiento en el CAS sobre la LTP de la CI, revelando la relevancia de la activación de la PKC para la formación del CAS y para el efecto del de éste sobre la LTP.

### **7.4.3. Proteína cinasa A (PKA)**

La PKA es una proteína cinasa activada por AMPc (8-bromo-3-5 monofosfato de adenosina cíclico) la cual es considerada como mediadora de diferentes procesos celulares como el crecimiento y diferenciación celular o la modulación de determinados canales iónicos (Skalhegg & Tasken, 1997; Tasken et al., 1997). La actividad de la PKA se encuentra relacionada con el establecimiento de la memoria a largo plazo de tareas aversivas como el CAS (Koh & Bernstein, 2003; Koh et al., 2003). Por ejemplo se ha reportado que la inhibición de la PKA en la amígdala inhibe la memoria de largo plazo del CAS, pero no afecta la memoria de corto plazo (Koh et al., 2002). En la CI se ha reportado que la inhibición de la PKA tiene injerencia en la memoria de reconocimiento a objetos (Roozendaal et al., 2010). Asimismo, la infusión de un análogo del segundo mensajero AMPc, el cual estimula a la PKA, incrementa el condicionamiento aversivo a los sabores cuando es infundido en la CI (Miranda et al., 2002). En esta investigación demostramos que el CAS es inhibido mediante el bloqueo farmacológico de la PKA en la CI. Sin embargo, no observamos modificaciones en el efecto del CAS sobre la inducción subsecuente de LTP al inhibir ésta cinasa. A este respecto, se ha propuesto que la activación de PKA también participa en los fenómenos metaplásticos, pero a diferencia de los efectos metaplásticos derivados de la activación del receptor NMDA, la activación de PKA favorece la posibilidad de inducir LTP (Abraham, 2008). En este mismo orden de ideas, se ha reportado que la fosforilación de CREB en el residuo ser<sup>133</sup> por la PKA, facilita la inducción de LTP en el hipocampo (Barco et al., 2002; Chen et al., 2010). Además, se ha observado que la activación de los receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGlu) activan a la PKA, que a su vez fosforila a la subunidad gluR1 del receptor AMPA en el residuo ser<sup>845</sup> (Gao et al., 2006; Oh et al., 2006). La fosforilación de la subunidad gluR1 promueve la exocitosis del receptor AMPA en la densidad posináptica, facilitando de este modo la inducción de LTP (Abraham, 2008). Estas evidencias muestran que la metaplasticidad

dependiente de los receptores mGlu se observa como un incremento en la posibilidad de inducir LTP, es decir que con la misma frecuencia de estimulación es posible inducir una LTP de mayor magnitud (Barco et al., 2002; Abraham, 2008). Los cambios metaplásticos dependientes de la activación de los receptores mGlu y de la PKA difieren de los cambios metaplásticos inducidos por los receptores NMDA los cuales originan decrementos en la posibilidad de inducir LTP (Barco et al., 2002; Abraham, 2008). Por tanto, la metaplasticidad inducida por los receptores mGlu donde interviene la PKA difiere del efecto metaplástico presentado en este estudio, donde el entrenamiento en el CAS redujo la posibilidad de inducir LTP en la CI. Estos resultados muestran que si bien el CAS es dependiente de la activación de la PKA, esta proteína no es necesaria durante la modificación metaplástica originada por el CAS sobre la inducción de LTP en la CI. Asimismo, estos resultados revelan que el CAS y el efecto metaplástico producido por esta conducta comparten algunos mecanismos celulares pero difieren en el requerimiento de ciertas proteínas.

#### ***7.4.4. Síntesis de proteínas***

Actualmente se considera que es necesario un cambio en la producción de determinadas proteínas relacionadas con la plasticidad para la persistencia de la memoria en diversas áreas del SN (Klann & Sweatt, 2008). La traducción de nuevas proteínas es indispensable para la consolidación pero no para la adquisición de la memoria (Quevedo et al., 1999; Bekinschtein et al., 2007). Por ejemplo, se ha reportado que la inhibición de la síntesis de proteínas inhibe la consolidación pero no la adquisición del CAS (Rosenblum et al., 1993; Serova et al., 1996; Berman & Dudai, 2001; Moguel-Gonzalez et al., 2008) e incluso la inhibición de proteínas que regulan la traducción como mTOR (blanco de la rapamicina en los mamíferos) son capaces de bloquear la consolidación del CAS (Belelovsky et al., 2009). En este estudio mostramos que la infusión de anisomicina, en una concentración que es capaz de inhibir por 90 minutos el 90% de la síntesis de proteínas (Rosenblum et al., 1993; Berman & Dudai, 2001; Moguel-Gonzalez et al., 2008) bloquea el CAS e inhibe el efecto de dicho condicionamiento sobre la inducción subsecuente de LTP en la CI. Aun cuando no se conoce con certeza la injerencia que tiene la síntesis de proteínas en los

fenómenos metaplásticos, se ha sugerido que la síntesis de nuevas proteínas es requerida durante estos procesos (Abraham, 2008). Nuestros resultados muestran que los cambios en la producción de proteínas iniciados por el entrenamiento en el CAS son esenciales para la formación de cambios en las propiedades plásticas de la CI.

## 8. CONCLUSIONES

Hoy en día se considera que diversas expresiones de plasticidad sináptica actúan de manera conjunta orquestando la inducción y el mantenimiento de cambios sinápticos asociados con la experiencia (Smith et al., 2009). En este sentido, se considera que cambios homeostáticos como la metaplasticidad juegan un papel crucial en la formación y la persistencia de la memoria (Pérez-Otaño & Ehlers, 2005; Abraham, 2008).

Los resultados derivados del presente estudio muestran que:

- El entrenamiento en el CAS bloquea la inducción de LTP en la vía de comunicación Bla-CI.
- El entrenamiento en el CAS incrementa la excitabilidad de las neuronas de la proyección Bla-CI, que se refleja en un incremento las curvas I/O. Este resultado sugiere que el entrenamiento en el CAS induce un incremento en la eficiencia sináptica de la proyección Bla-CI, que a su vez modifica la posibilidad de inducir plasticidad sináptica subsecuente.
- El efecto del CAS sobre la inducción subsecuente de LTP en la CI es persistente por lo menos hasta 5 días después del entrenamiento.
- El bloqueo de los receptores NMDA así como la inhibición farmacológica de la PKC y de la síntesis de proteínas en la CI evitan el efecto del entrenamiento en el CAS sobre la inducción subsecuente de LTP en dicha área neocortical. Sin embargo, la inhibición farmacológica de la PKA evita la formación del CAS, pero no el efecto del CAS sobre la LTP en la CI.

En resumen, nuestros resultados muestran que el entrenamiento en el CAS modifica persistentemente las propiedades sinápticas de la proyección Bla-CI, sugiriendo que los cambios en la habilidad de inducir plasticidad sináptica subsecuente contribuyen a la formación y mantenimiento de memorias aversivas.

## 9. REFERENCIAS

- Abraham, W.C. (2008). Metaplasticity: tuning synapses and networks for plasticity. *Nat Rev Neurosci*.
- Abraham, W.C. & Bear, M.F. (1996). Metaplasticity: the plasticity of synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 19, 126-130.
- Accolla, R. & Carleton, A. (2008). Internal body state influences topographical plasticity of sensory representations in the rat gustatory cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Artola, A., Von Frijtag, J.C., Fermont, P.C., Gispen, W.H., Schrama, L.H., Kamal, A. & Spruijt, B.M. (2006). Long-lasting modulation of the induction of LTD and LTP in rat hippocampal CA1 by behavioural stress and environmental enrichment. *Eur J Neurosci* 23, 261-272.
- Ascher, P., Bregestovski, P. & Nowak, L. (1988). N-methyl-D-aspartate-activated channels of mouse central neurones in magnesium-free solutions. *J Physiol* 399, 207-226.
- Barco, A., Alarcon, J.M. & Kandel, E.R. (2002). Expression of constitutively active CREB protein facilitates the late phase of long-term potentiation by enhancing synaptic capture. *Cell* 108, 689-703.
- Bear, M.F. (1996). A synaptic basis for memory storage in the cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13453-13459.
- Bear, M.F. (2003). Bidirectional synaptic plasticity: from theory to reality. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358, 649-655.
- Bear, M.F., Connors, B.W. & Paradiso, M.A. (2001). *Neuroscience : exploring the brain*. Baltimore, Md.: Lippincott Williams & Wilkins.
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Igaz, L.M., Bevilacqua, L.R., Izquierdo, I. & Medina, J.H. (2007). Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. *Neuron* 53, 261-277.
- Belelovsky, K., Kaphzan, H., Elkobi, A. & Rosenblum, K. (2009). Biphasic activation of the mTOR pathway in the gustatory cortex is correlated with and necessary for taste learning. *J Neurosci* 29, 7424-7431.
- Berman, D.E. & Dudai, Y. (2001). Memory extinction, learning anew, and learning the new: dissociations in the molecular machinery of learning in cortex. *Science* 291, 2417-2419.
- Bermúdez-Rattoni, F. (2004). Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nat Rev Neurosci* 5, 209-217.
- Bermúdez-Rattoni, F. & Mcgaugh, J.L. (1991). Insular cortex and amygdala lesions differentially affect acquisition on inhibitory avoidance and conditioned taste aversion. *Brain Res* 549, 165-170.
- Bermúdez-Rattoni, F., Nunez-Jaramillo, L. & Balderas, I. (2005). Neurobiology of taste-recognition memory formation. *Chem Senses* 30 Suppl 1, i156-157.
- Bernstein, I.L. & Koh, M.T. (2007). Molecular signaling during taste aversion learning. *Chem Senses* 32, 99-103.
- Besle, J., Bertrand, O. & Giard, M.H. (2009). Electrophysiological (EEG, sEEG, MEG) evidence for multiple audiovisual interactions in the human auditory cortex. *Hear Res* 258, 143-151.

- Bienenstock, E.L., Cooper, L.N. & Munro, P.W. (1982). Theory for the development of neuron selectivity: orientation specificity and binocular interaction in visual cortex. *J Neurosci* 2, 32-48.
- Bliss, T.V. & Gardner-Medwin, A.R. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232, 357-374.
- Bliss, T.V. & Lømo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232, 331-356.
- Blitzer, R.D., Connor, J.H., Brown, G.P., Wong, T., Shenolikar, S., Iyengar, R. & Landau, E.M. (1998). Gating of CaMKII by cAMP-regulated protein phosphatase activity during LTP. *Science* 280, 1940-1942.
- Blitzer, R.D., Wong, T., Nouranifar, R., Iyengar, R. & Landau, E.M. (1995). Postsynaptic cAMP pathway gates early LTP in hippocampal CA1 region. *Neuron* 15, 1403-1414.
- Boehm, J., Kang, M.G., Johnson, R.C., Esteban, J., Hugarir, R.L. & Malinow, R. (2006). Synaptic incorporation of AMPA receptors during LTP is controlled by a PKC phosphorylation site on GluR1. *Neuron* 51, 213-225.
- Bortolotto, Z.A. & Collingridge, G.L. (2000). A role for protein kinase C in a form of metaplasticity that regulates the induction of long-term potentiation at CA1 synapses of the adult rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 12, 4055-4062.
- Bradley, R.M. & Mistretta, C.M. (1971). Intravascular taste in rats as demonstrated by conditioned aversion to sodium saccharin. *J Comp Physiol Psychol* 75, 186-189.
- Bures, J. & Buresova, O. (1989). Conditioned taste aversion elicited by intracerebral administration of drugs. *Acta Physiol Hung* 74, 77-93.
- Citri, A. & Malenka, R.C. (2008). Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33, 18-41.
- Clem, R.L., Celikel, T. & Barth, A.L. (2008). Ongoing in vivo experience triggers synaptic metaplasticity in the neocortex. *Science* 319, 101-104.
- Cohen, A.S., Coussens, C.M., Raymond, C.R. & Abraham, W.C. (1999). Long-lasting increase in cellular excitability associated with the priming of LTP induction in rat hippocampus. *J Neurophysiol* 82, 3139-3148.
- Cooke, S.F. & Bear, M.F. (2010). Visual experience induces long-term potentiation in the primary visual cortex. *J Neurosci* 30, 16304-16313.
- Cooper, L.N., Liberman, F. & Oja, E. (1979). A theory for the acquisition and loss of neuron specificity in visual cortex. *Biol Cybern* 33, 9-28.
- Cormier, R.J. & Kelly, P.T. (1996). Glutamate-induced long-term potentiation enhances spontaneous EPSC amplitude but not frequency. *J Neurophysiol* 75, 1909-1918.
- Chen, L., Cai, W., Zhou, R., Furuya, K. & Sokabe, M. (2010). Modulatory metaplasticity induced by pregnenolone sulfate in the rat hippocampus: a leftward shift in LTP/LTD-frequency curve. *Hippocampus* 20, 499-512.
- Domjan, M. (1985). Cue-consequence specificity and long-delay learning revisited. *Ann N Y Acad Sci* 443, 54-66.
- Dringenberg, H.C., Oliveira, D. & Habib, D. (2008). Predator (cat hair)-induced enhancement of hippocampal long-term potentiation in rats: involvement of acetylcholine. *Learn Mem* 15, 112-116.

- Eichenbaum, H. (1996). Learning from LTP: a comment on recent attempts to identify cellular and molecular mechanisms of memory. *Learn Mem* 3, 61-73.
- Engert, F. & Bonhoeffer, T. (1999). Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* 399, 66-70.
- Erreger, K., Dravid, S.M., Banke, T.G., Wyllie, D.J. & Traynelis, S.F. (2005). Subunit-specific gating controls rat NR1/NR2A and NR1/NR2B NMDA channel kinetics and synaptic signalling profiles. *J Physiol* 563, 345-358.
- Escobar, M., Fernandez, J., Guevara-Aguilar, R. & Bermudez-Rattoni, F. (1989). Fetal brain grafts induce recovery of learning deficits and connectivity in rats with gustatory neocortex lesion. *Brain Res* 478, 368-374.
- Escobar, M.L., Alcocer, I. & Bermudez-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. *Behav Brain Res* 129, 101-106.
- Escobar, M.L., Alcocer, I. & Chao, V. (1998a). The NMDA receptor antagonist CPP impairs conditioned taste aversion and insular cortex long-term potentiation in vivo. *Brain Res* 812, 246-251.
- Escobar, M.L. & Bermudez-Rattoni, F. (2000). Long-term potentiation in the insular cortex enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Res* 852, 208-212.
- Escobar, M.L., Chao, V. & Bermudez-Rattoni, F. (1998b). In vivo long-term potentiation in the insular cortex: NMDA receptor dependence. *Brain Res* 779, 314-319.
- Feldman, D.E. (2009). Synaptic mechanisms for plasticity in neocortex. *Annu Rev Neurosci* 32, 33-55.
- Gallo, M., Roldan, G. & Bures, J. (1992). Differential involvement of gustatory insular cortex and amygdala in the acquisition and retrieval of conditioned taste aversion in rats. *Behav Brain Res* 52, 91-97.
- Gao, C., Sun, X. & Wolf, M.E. (2006). Activation of D1 dopamine receptors increases surface expression of AMPA receptors and facilitates their synaptic incorporation in cultured hippocampal neurons. *J Neurochem* 98, 1664-1677.
- Garcia, J., Kimeldorf, D.J. & Koelling, R.A. (1955). Conditioned aversion to saccharin resulting from exposure to gamma radiation. *Science* 122, 157-158.
- Garcia, J. & Koelling, R.A. (1966). Relation of cue to consequence in avoidance learning. *Psychonomic Science* 4, 123-124.
- Garcia, J., Lasiter, P.S., Bermudez-Rattoni, F. & Deems, D.A. (1985). A general theory of aversion learning. *Ann N Y Acad Sci* 443, 8-21.
- Gerfen, C.R. & Clavier, R.M. (1979). Neural inputs to the prefrontal agranular insular cortex in the rat: horseradish peroxidase study. *Brain Res Bull* 4, 347-353.
- Grossman, S.E., Fontanini, A., Wieskopf, J.S. & Katz, D.B. (2008). Learning-related plasticity of temporal coding in simultaneously recorded amygdala-cortical ensembles. *J Neurosci* 28, 2864-2873.
- Guzman-Ramos, K., Osorio-Gomez, D., Moreno-Castilla, P. & Bermudez-Rattoni, F. (2010). Off-line concomitant release of dopamine and



- glutamate involvement in taste memory consolidation. *J Neurochem* 114, 226-236.
- Hagiwara, M., Brindle, P., Harootunian, A., Armstrong, R., Rivier, J., Vale, W., Tsien, R. & Montminy, M.R. (1993). Coupling of hormonal stimulation and transcription via the cyclic AMP-responsive factor CREB is rate limited by nuclear entry of protein kinase A. *Mol Cell Biol* 13, 4852-4859.
- Hirata, R., Matsumoto, M., Judo, C., Yamaguchi, T., Izumi, T., Yoshioka, M. & Togashi, H. (2009). Possible relationship between the stress-induced synaptic response and metaplasticity in the hippocampal CA1 field of freely moving rats. *Synapse* 63, 549-556.
- Hong, I., Kim, J., Lee, J., Park, S., Song, B., An, B., Park, K., Lee, H.W., Lee, S., Kim, H., Park, S.H., Eom, K.D. & Choi, S. (2011). Reversible plasticity of fear memory-encoding amygdala synaptic circuits even after fear memory consolidation. *PLoS One* 6, e24260.
- Hrabetova, S. & Sacktor, T.C. (1996). Bidirectional regulation of protein kinase M zeta in the maintenance of long-term potentiation and long-term depression. *J Neurosci* 16, 5324-5333.
- Huang, Y.Y., Colino, A., Selig, D.K. & Malenka, R.C. (1992). The influence of prior synaptic activity on the induction of long-term potentiation. *Science* 255, 730-733.
- Jahr, C.E. & Stevens, C.F. (1987). Glutamate activates multiple single channel conductances in hippocampal neurons. *Nature* 325, 522-525.
- Jedlicka, P. (2002). Synaptic plasticity, metaplasticity and BCM theory. *Bratisl Lek Listy* 103, 137-143.
- Jones, M.W., French, P.J., Bliss, T.V. & Rosenblum, K. (1999). Molecular mechanisms of long-term potentiation in the insular cortex in vivo. *J Neurosci* 19, RC36.
- Jung, P. & Ziemann, U. (2009). Homeostatic and nonhomeostatic modulation of learning in human motor cortex. *J Neurosci* 29, 5597-5604.
- Kandel, E.R. & Hawkins, R.D. (1992). The biological basis of learning and individuality. *Sci Am* 267, 78-86.
- Kinomura, S., Kawashima, R., Yamada, K., Ono, S., Itoh, M., Yoshioka, S., Yamaguchi, T., Matsui, H., Miyazawa, H., Itoh, H. & Et Al. (1994). Functional anatomy of taste perception in the human brain studied with positron emission tomography. *Brain Res* 659, 263-266.
- Kitagawa, H., Inoue, K., Nishida, A., Nishimura, Y., Yamamoto, T. & Nishimura, Y. (2004). NMDA receptor-dependent long-term potentiation is dependent on low-voltage-activated calcium currents in the sensorimotor cortex of cats. *Brain Res* 1008, 116-119.
- Klann, E. & Sweatt, J.D. (2008). Altered protein synthesis is a trigger for long-term memory formation. *Neurobiol Learn Mem* 89, 247-259.
- Koh, M.T. & Bernstein, I.L. (2003). Inhibition of protein kinase A activity during conditioned taste aversion retrieval: interference with extinction or reconsolidation of a memory? *Neuroreport* 14, 405-407.
- Koh, M.T., Clarke, S.N., Spray, K.J., Thiele, T.E. & Bernstein, I.L. (2003). Conditioned taste aversion memory and c-Fos induction are disrupted in RIIbeta-protein kinase A mutant mice. *Behav Brain Res* 143, 57-63.
- Koh, M.T., Thiele, T.E. & Bernstein, I.L. (2002). Inhibition of protein kinase A activity interferes with long-term, but not short-term, memory of conditioned taste aversions. *Behav Neurosci* 116, 1070-1074.

- Kuo, M.F., Unger, M., Liebetanz, D., Lang, N., Tergau, F., Paulus, W. & Nitsche, M.A. (2008). Limited impact of homeostatic plasticity on motor learning in humans. *Neuropsychologia* 46, 2122-2128.
- Langwieser, N., Christel, C.J., Kleppisch, T., Hofmann, F., Wotjak, C.T. & Moosmang, S. (2010). Homeostatic switch in hebbian plasticity and fear learning after sustained loss of Cav1.2 calcium channels. *J Neurosci* 30, 8367-8375.
- Lasiter, P.S., Deems, D.A., Oetting, R.L. & Garcia, J. (1985). Taste discriminations in rats lacking anterior insular gustatory neocortex. *Physiol Behav* 35, 277-285.
- Ledoux, J.E. (1993). Emotional memory: in search of systems and synapses. *Ann N Y Acad Sci* 702, 149-157.
- Lisman, J. (1989). A mechanism for the Hebb and the anti-Hebb processes underlying learning and memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 9574-9578.
- Lømo, T. (Year). "Frequency potentiation of excitatory synaptic activity in the dentate area of the hippocampal formation.", in: *Acta Physiol. Scand.*, 128.
- Lynch, M.A. (2004). Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev* 84, 87-136.
- Macdonald, J.F., Jackson, M.F. & Beazely, M.A. (2006). Hippocampal long-term synaptic plasticity and signal amplification of NMDA receptors. *Crit Rev Neurobiol* 18, 71-84.
- Makhinson, M., Chotiner, J.K., Watson, J.B. & O'dell, T.J. (1999). Adenylyl cyclase activation modulates activity-dependent changes in synaptic strength and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II autophosphorylation. *J Neurosci* 19, 2500-2510.
- Malenka, R.C. (1991). Postsynaptic factors control the duration of synaptic enhancement in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* 6, 53-60.
- Malenka, R.C. & Bear, M.F. (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44, 5-21.
- Malenka, R.C., Kauer, J.A., Perkel, D.J. & Nicoll, R.A. (1989). The impact of postsynaptic calcium on synaptic transmission--its role in long-term potentiation. *Trends Neurosci* 12, 444-450.
- Malenka, R.C. & Nicoll, R.A. (1999). Long-term potentiation--a decade of progress? *Science* 285, 1870-1874.
- Malinow, R., Mainen, Z.F. & Hayashi, Y. (2000). LTP mechanisms: from silence to four-lane traffic. *Curr Opin Neurobiol* 10, 352-357.
- Malinow, R. & Malenka, R.C. (2002). AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 25, 103-126.
- Mcgaugh, J.L., Castellano, C. & Brioni, J. (1990). Picrotoxin enhances latent extinction of conditioned fear. *Behav Neurosci* 104, 264-267.
- Mckernan, M.G. & Shinnick-Gallagher, P. (1997). Fear conditioning induces a lasting potentiation of synaptic currents in vitro. *Nature* 390, 607-611.
- Milner, B., Squire, L.R. & Kandel, E.R. (1998). Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron* 20, 445-468.
- Miranda, M.I., Ferreira, G., Ramirez-Lugo, L. & Bermudez-Rattoni, F. (2002). Glutamatergic activity in the amygdala signals visceral input during taste memory formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11417-11422.

- Moguel-Gonzalez, M., Gomez-Palacio-Schjetnan, A. & Escobar, M.L. (2008). BDNF reverses the CTA memory deficits produced by inhibition of protein synthesis. *Neurobiol Learn Mem* 90, 584-587.
- Molnar, E. (2011). Long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. *Semin Cell Dev Biol*.
- Monfils, M.H. & Teskey, G.C. (2004). Skilled-learning-induced potentiation in rat sensorimotor cortex: a transient form of behavioural long-term potentiation. *Neuroscience* 125, 329-336.
- Moser, E.I., Krobot, K.A., Moser, M.B. & Morris, R.G. (1998). Impaired spatial learning after saturation of long-term potentiation. *Science* 281, 2038-2042.
- Muller, J.F., Orekhov, Y., Liu, Y. & Ziemann, U. (2007). Homeostatic plasticity in human motor cortex demonstrated by two consecutive sessions of paired associative stimulation. *Eur J Neurosci* 25, 3461-3468.
- Nishiyama, M., Hong, K., Mikoshiba, K., Poo, M.M. & Kato, K. (2000). Calcium stores regulate the polarity and input specificity of synaptic modification. *Nature* 408, 584-588.
- Norgren, R. & Leonard, C.M. (1971). Taste pathways in rat brainstem. *Science* 173, 1136-1139.
- Norgren, R. & Leonard, C.M. (1973). Ascending central gustatory pathways. *J Comp Neurol* 150, 217-237.
- Nunez-Jaramillo, L., Delint-Ramirez, I. & Bermudez-Rattoni, F. (2007). PKC blockade differentially affects aversive but not appetitive gustatory memories. *Brain Res* 1148, 177-182.
- Oh, M.C., Derkach, V.A., Guire, E.S. & Soderling, T.R. (2006). Extrasynaptic membrane trafficking regulated by GluR1 serine 845 phosphorylation primes AMPA receptors for long-term potentiation. *J Biol Chem* 281, 752-758.
- Otsubo, T., Maekawa, M., Nagai, T., Sakio, H. & Hori, Y. (2008). Facilitatory effects of subanesthetic sevoflurane on excitatory synaptic transmission and synaptic plasticity in the mouse hippocampal CA1 area. *Brain Res* 1197, 32-39.
- Pastalkova, E., Serrano, P., Pinkhasova, D., Wallace, E., Fenton, A.A. & Sacktor, T.C. (2006). Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. *Science* 313, 1141-1144.
- Paxinos, G., Watson, C., Pennisi, M. & Topple, A. (1985). Bregma, lambda and the interaural midpoint in stereotaxic surgery with rats of different sex, strain and weight. *J Neurosci Methods* 13, 139-143.
- Pérez-Otaño, I. & Ehlers, M.D. (2005). Homeostatic plasticity and NMDA receptor trafficking. *Trends Neurosci* 28, 229-238.
- Philpot, B.D., Cho, K.K. & Bear, M.F. (2007). Obligatory role of NR2A for metaplasticity in visual cortex. *Neuron* 53, 495-502.
- Philpot, B.D., Sekhar, A.K., Shouval, H.Z. & Bear, M.F. (2001). Visual experience and deprivation bidirectionally modify the composition and function of NMDA receptors in visual cortex. *Neuron* 29, 157-169.
- Pritchard, T.C., Hamilton, R.B., Morse, J.R. & Norgren, R. (1986). Projections of thalamic gustatory and lingual areas in the monkey, *Macaca fascicularis*. *J Comp Neurol* 244, 213-228.
- Quevedo, J., Vianna, M.R., Roesler, R., De-Paris, F., Izquierdo, I. & Rose, S.P. (1999). Two time windows of anisomycin-induced amnesia for inhibitory

- avoidance training in rats: protection from amnesia by pretraining but not pre-exposure to the task apparatus. *Learn Mem* 6, 600-607.
- Quinlan, E.M., Lebel, D., Brosh, I. & Barkai, E. (2004). A molecular mechanism for stabilization of learning-induced synaptic modifications. *Neuron* 41, 185-192.
- Quinlan, E.M., Philpot, B.D., Hugarir, R.L. & Bear, M.F. (1999). Rapid, experience-dependent expression of synaptic NMDA receptors in visual cortex in vivo. *Nat Neurosci* 2, 352-357.
- Rebola, N., Carta, M., Lanore, F., Blanchet, C. & Mulle, C. (2011). NMDA receptor-dependent metaplasticity at hippocampal mossy fiber synapses. *Nat Neurosci* 14, 691-693.
- Reutter, K. & Witt, M. (1993). "Morphology of vertebrate taste organs and their nerve supply. ," in *Mechanisms of taste transduction*, eds. S.A. Simon & S.D. Roper. (Boca Raton: CRC Press), 29-82.
- Rioutl-Pedotti, M.S., Friedman, D. & Donoghue, J.P. (2000). Learning-induced LTP in neocortex. *Science* 290, 533-536.
- Rioutl-Pedotti, M.S., Friedman, D., Hess, G. & Donoghue, J.P. (1998). Strengthening of horizontal cortical connections following skill learning. *Nat Neurosci* 1, 230-234.
- Roberts, A.C. & Glanzman, D.L. (2003). Learning in Aplysia: looking at synaptic plasticity from both sides. *Trends Neurosci* 26, 662-670.
- Rogan, M.T., Staubli, U.V. & Ledoux, J.E. (1997). Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature* 390, 604-607.
- Roosendaal, B., Hernandez, A., Cabrera, S.M., Hagewoud, R., Malvaez, M., Stefanko, D.P., Haettig, J. & Wood, M.A. (2010). Membrane-associated glucocorticoid activity is necessary for modulation of long-term memory via chromatin modification. *J Neurosci* 30, 5037-5046.
- Rosenblum, K., Meiri, N. & Dudai, Y. (1993). Taste memory: the role of protein synthesis in gustatory cortex. *Behav Neural Biol* 59, 49-56.
- Rudy, J.W. & Matus-Amat, P. (2009). DHPG activation of group 1 mGluRs in BLA enhances fear conditioning. *Learn Mem* 16, 421-425.
- Sacchetti, B. & Bielavska, E. (1998). Chelerythrine, a specific PKC inhibitor, blocks acquisition but not consolidation and retrieval of conditioned taste aversion in rat. *Brain Res* 799, 84-90.
- Sacktor, T.C. (2011). How does PKMzeta maintain long-term memory? *Nat Rev Neurosci* 12, 9-15.
- Schroeder, B.W. & Shinnick-Gallagher, P. (2004). Fear memories induce a switch in stimulus response and signaling mechanisms for long-term potentiation in the lateral amygdala. *Eur J Neurosci* 20, 549-556.
- Schroeder, B.W. & Shinnick-Gallagher, P. (2005). Fear learning induces persistent facilitation of amygdala synaptic transmission. *Eur J Neurosci* 22, 1775-1783.
- Serova, O.N., Solov'eva, N.A., Lagutina, L.V. & Obukhova, M.F. (1996). Formation of taste aversion and preference in protein synthesis inhibition in rats. *Neurosci Behav Physiol* 26, 477-481.
- Shema, R., Haramati, S., Ron, S., Hazvi, S., Chen, A., Sacktor, T.C. & Dudai, Y. (2011). Enhancement of consolidated long-term memory by overexpression of protein kinase Mzeta in the neocortex. *Science* 331, 1207-1210.

- Shema, R., Sacktor, T.C. & Dudai, Y. (2007). Rapid erasure of long-term memory associations in the cortex by an inhibitor of PKM zeta. *Science* 317, 951-953.
- Skalhegg, B.S. & Tasken, K. (1997). Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front Biosci* 2, d331-342.
- Smith, G.B., Heynen, A.J. & Bear, M.F. (2009). Bidirectional synaptic mechanisms of ocular dominance plasticity in visual cortex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364, 357-367.
- Stanton, P.K. (1996). LTD, LTP, and the sliding threshold for long-term synaptic plasticity. *Hippocampus* 6, 35-42.
- Taattola, K.L. (2004). "Review on protein kinase C family members and their activation mechanisms.", in: *Proceedings of the 2nd TICSP Workshop on Computational Systems Biology, WCSB'2004*. (eds.) T. Aho, H. Lähdesmäki & O. Yli-Harja. (Silja Opera, Helsinki-St.Petersburg).
- Tagamets, M.A. & Horwitz, B. (2000). A model of working memory: bridging the gap between electrophysiology and human brain imaging. *Neural Netw* 13, 941-952.
- Taniike, N., Lu, Y.F., Tomizawa, K. & Matsui, H. (2008). Critical differences in magnitude and duration of N-methyl D-aspartate(NMDA) receptor activation between long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD) induction. *Acta Med Okayama* 62, 21-28.
- Tasken, K., Skalhegg, B.S., Tasken, K.A., Solberg, R., Knutsen, H.K., Levy, F.O., Sandberg, M., Orstavik, S., Larsen, T., Johansen, A.K., Vang, T., Schrader, H.P., Reinton, N.T., Torgersen, K.M., Hansson, V. & Jahnsen, T. (1997). Structure, function, and regulation of human cAMP-dependent protein kinases. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 31, 191-204.
- Toni, N., Buchs, P.A., Nikonenko, I., Bron, C.R. & Muller, D. (1999). LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. *Nature* 402, 421-425.
- Turrigiano, G. (2011). Too many cooks? Intrinsic and synaptic homeostatic mechanisms in cortical circuit refinement. *Annu Rev Neurosci* 34, 89-103.
- Turrigiano, G.G. (2008). The self-tuning neuron: synaptic scaling of excitatory synapses. *Cell* 135, 422-435.
- Turrigiano, G.G. & Nelson, S.B. (2004). Homeostatic plasticity in the developing nervous system. *Nat Rev Neurosci* 5, 97-107.
- Van Der Zee, E.A., Palm, I.F., O'connor, M., Maizels, E.T., Hunzicker-Dunn, M. & Disterhoft, J.F. (2004). Aging-related alterations in the distribution of Ca(2+)-dependent PKC isoforms in rabbit hippocampus. *Hippocampus* 14, 849-860.
- Voglis, G. & Tavernarakis, N. (2006). The role of synaptic ion channels in synaptic plasticity. *EMBO Rep* 7, 1104-1110.
- Wang, M.N., Dong, Z.F., Cao, J. & Xu, L. (2006). Repeated morphine treatment influences operant and spatial learning differentially. *Neurosci Bull* 22, 137-143.
- Weiner, I., Tarrasch, R., Hasson, O., Forian, R., Smith, A.D., Rawlins, J.N. & Feldon, J. (1994). The effects of chronic administration of ceronapril on

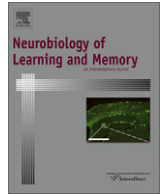
- the partial reinforcement extinction effect and latent inhibition in rats. *Behav Pharmacol* 5, 306-314.
- Wells, D.G. & Fallon, J.R. (2000). In search of molecular memory: experience-driven protein synthesis. *Cell Mol Life Sci* 57, 1335-1339.
- Whitlock, J.R., Heynen, A.J., Shuler, M.G. & Bear, M.F. (2006). Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science* 313, 1093-1097.
- Wilson, N.R., Ty, M.T., Ingber, D.E., Sur, M. & Liu, G. (2007). Synaptic reorganization in scaled networks of controlled size. *J Neurosci* 27, 13581-13589.
- Yamamoto, T., Matsuo, R., Kiyomitsu, Y. & Kitamura, R. (1989). Taste responses of cortical neurons in freely ingesting rats. *J Neurophysiol* 61, 1244-1258.
- Yamamoto, T., Shimura, T., Sako, N., Azuma, S., Bai, W.Z. & Wakisaka, S. (1992). C-fos expression in the rat brain after intraperitoneal injection of lithium chloride. *Neuroreport* 3, 1049-1052.
- Yang, H.W., Hu, X.D., Zhang, H.M., Xin, W.J., Li, M.T., Zhang, T., Zhou, L.J. & Liu, X.G. (2004). Roles of CaMKII, PKA, and PKC in the induction and maintenance of LTP of C-fiber-evoked field potentials in rat spinal dorsal horn. *J Neurophysiol* 91, 1122-1133.
- Yasoshima, Y., Morimoto, T. & Yamamoto, T. (2000). Different disruptive effects on the acquisition and expression of conditioned taste aversion by blockades of amygdalar ionotropic and metabotropic glutamatergic receptor subtypes in rats. *Brain Res* 869, 15-24.
- Zakharenko, S.S., Patterson, S.L., Dragatsis, I., Zeitlin, S.O., Siegelbaum, S.A., Kandel, E.R. & Morozov, A. (2003). Presynaptic BDNF required for a presynaptic but not postsynaptic component of LTP at hippocampal CA1-CA3 synapses. *Neuron* 39, 975-990.
- Zhang, L., Kirschstein, T., Sommersberg, B., Merkens, M., Manahan-Vaughan, D., Elgersma, Y. & Beck, H. (2005). Hippocampal synaptic metaplasticity requires inhibitory autophosphorylation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II. *J Neurosci* 25, 7697-7707.

## 10. ANEXO 1

El anexo 1 corresponde al artículo que conjunta los principales hallazgos del proyecto de investigación que se presentan en esta tesis. Específicamente muestra que el CAS modifica de manera persistente la inducción de LTP en la vía Bla-CI y que éste efecto es dependiente de la síntesis de proteínas. El artículo fue aceptado en marzo del 2011 y publicado en mayo del mismo año.

### Referencia:

Rodríguez-Durán, L. F., Castillo, D. V., Moguel-González, M., Escobar M. L., (2011), Conditioned taste aversion modifies persistently the subsequent induction of neocortical long-term potentiation in vivo. *Neurobiology of Learning and Memory*, 95(4): 519-26



## Conditioned taste aversion modifies persistently the subsequent induction of neocortical long-term potentiation *in vivo*

Luis F. Rodríguez-Durán, Diana V. Castillo, Minerva Moguel-González, Martha L. Escobar\*

División de Investigación y Estudios de Posgrado, Facultad de Psicología, Universidad Nacional Autónoma de México, C.P. 04360 México DF, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 15 September 2010

Revised 24 February 2011

Accepted 21 March 2011

Available online 1 April 2011

#### Keywords:

Synaptic plasticity

LTP

CTA

Insular cortex

Metaplasticity

### ABSTRACT

The ability of neurons to modify their synaptic strength in an activity-dependent manner has a crucial role in learning and memory processes. It has been proposed that homeostatic forms of plasticity might provide the global regulation necessary to maintain synaptic strength and plasticity within a functional dynamic range. Similarly, it is considered that the capacity of synapses to express plastic changes is itself subject to variation dependent on previous experience. In particular, training in several behavioral tasks modifies the possibility to induce long-term potentiation (LTP). Our previous studies in the insular cortex (IC) have shown that induction of LTP in the basolateral amygdaloid nucleus (Bla)-IC projection previous to conditioned taste aversion (CTA) training enhances the retention of this task. The aim of the present study was to analyze whether CTA training modifies the ability to induce subsequent LTP in the Bla-IC projection *in vivo*. Thus, CTA trained rats received high frequency stimulation in the Bla-IC projection in order to induce LTP 48, 72, 96 and 120 h after the aversion test. Our results show that CTA training prevents the subsequent induction of LTP in the Bla-IC projection, for at least 120 h after CTA training. We also showed that pharmacological inhibition of CTA consolidation with anisomycin (1  $\mu$ l/side; 100  $\mu$ g/ $\mu$ l) prevents the CTA effect on IC-LTP. These findings reveal that CTA training produces a persistent change in the ability to induce subsequent LTP in the Bla-IC projection in a protein-synthesis dependent manner, suggesting that changes in the ability to induce subsequent synaptic plasticity contribute to the formation and persistence of aversive memories.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Homeostatic synaptic changes stabilize neural networks and maintain synaptic plasticity in a functional dynamic range (Perez-Otaño & Ehlers, 2005; Turrigiano, 2007). Metaplasticity is a homeostatic synaptic mechanism that can alter the ability of synapses to undergo subsequent plastic modifications (Abraham, 2008; Xu et al., 2009). It has been observed that acquisition of aversive experiences is accompanied by long-lasting modifications in the ability to undergo further synaptic plasticity (Hirata et al., 2009; Rudy & Matus-Amat, 2009; Schroeder & Shinnick-Gallagher, 2005). Moreover, changes in the possibility to induce subsequent synaptic plasticity can persist for at least 10 days after training (Schroeder & Shinnick-Gallagher, 2005) suggesting that persistent changes in synaptic properties underlie long-term memory.

Long-term potentiation (LTP) is a long-lasting and activity-dependent increase in synaptic efficacy (Abraham, 2008), that is widely expressed in several neocortical areas. Studies of neocortical LTP have used a wide variety of stimulus protocols, pathways and conditions, sometimes including a reduction of GABA receptor-

mediated inhibition (Kanter & Haberly, 1993; Luhmann & Prince, 1990). However, the induction of LTP within several sites of neocortex in the absence of GABA blockade has been demonstrated, requiring a more strong stimulation (increasing the number of conditioning trains) in order to reduce the inhibitory activity of the neocortex (Castro-Alamancos & Connors, 1996; Escobar, Alcocer, & Chao, 1998; Escobar, Chao, & Bermudez-Rattoni, 1998; Jones, French, Bliss, & Rosenblum, 1999; Kirkwood & Bear, 1994; Racine, Wilson, Teskey, & Milgram, 1994; Werk & Chapman, 2003).

The insular cortex (IC) is a region of the temporal cortex in the rat that has been implicated in the acquisition and storage of different aversive-motivated learning tasks, like conditioned taste aversion (CTA). CTA is a very robust and widely used model for the study of learning and memory processes in which an animal acquires aversion to a novel taste when it is followed by digestive malaise (Bernstein & Koh, 2007; Bertrand et al., 2009). It has been demonstrated that tetanic stimulation of the basolateral amygdaloid nucleus (Bla) induced LTP in the IC (Escobar, Alcocer, et al., 1998; Escobar, Chao, et al., 1998; Jones et al., 1999). IC-LTP and CTA have similar molecular mechanisms, such as N-Methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-dependence (Escobar, Alcocer, & Bermudez-Rattoni, 2002; Escobar, Alcocer, et al., 1998; Escobar, Chao, et al., 1998), activation of ERK1/2 and immediately early genes expression

\* Corresponding author. Fax: +52 55 56222310.

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



(Jones et al., 1999). In addition, the induction of IC-LTP previous to CTA training enhanced the retention of this task (Escobar & Bermudez-Rattoni, 2000), suggesting that the capacity to express synaptic plasticity in the Bla-IC projection was modulated by the previous IC-LTP induction.

It has been proposed that CTA training produces long-lasting changes in the IC synaptic properties, although, its capacity to modulate the subsequent expression of synaptic plasticity remains unclear. Thus, the aim of the present study was to analyze whether CTA training modifies the possibility to induce subsequent LTP in the Bla-IC projection *in vivo*.

## 2. Methods

### 2.1. Animals

A total of 105 male Wistar rats weighting 350–380 g were used for our experiments. They were housed individually under a 12/12-h light–dark cycle, with food and water *ad libitum* (except where indicated) and an average room temperature of 22 °C.

### 2.2. Conditioned taste aversion

A previously described experimental procedure for CTA was used (Escobar & Bermudez-Rattoni, 2000; Escobar et al., 2002). Briefly, rats were deprived of water for 24 h and then habituated to drink water from a single graduated cylinder twice a day, during 10 min trials for 3 days. On the acquisition day, water was substituted for saccharin solution 0.1% (Sigma, St. Louis, MO), and 10 min later, the animals received 7.5 ml/kg *i.p.* of a 0.15 M solution of LiCl, which induces digestive malaise. After three more days of baseline consumption, water was substituted newly by a 0.1% saccharin solution to test the aversion. The reduction of saccharin consumption with respect to baseline intake was used as a measure of strength of aversion.

### 2.3. *In vivo* electrophysiological recordings

Electrophysiological recordings were performed in anesthetized rats as previously described (Escobar, Alcocer, et al., 1998; Escobar et al., 2002; Escobar & Bermudez-Rattoni, 2000). Briefly, rats were anesthetized with pentobarbital (50 mg/kg *i.p.*). IC responses were recorded unilaterally by using a monopolar stainless steel electrode 0.005 in. diameter. Constant current stimulation (50–70  $\mu$ A monophasic pulses, 0.25 ms duration) was provided via direct and unilateral stimulation of the Bla by using a stainless steel bipolar electrode. Bla and IC electrodes were aimed at the following stereotaxic coordinates: AP +1.2 mm, ML 5.5 mm, DV –5.5 mm  $\pm$  0.2 and AP –2.8 mm, ML –5.0 mm, DV –8.5 mm  $\pm$  0.2, respectively (Paxinos & Watson, 2007). The current intensity used was sufficient to evoke 50% of the maximal Bla-IC response. IC evoked responses were measured by obtaining the field excitatory postsynaptic potential (EPSP) slope measured 1–3 ms after the EPSP onset. Low-frequency responses were evoked once every 20 s throughout a 20 min baseline period. LTP was induced by delivering 10 trains of 100 Hz/1 s with an intertrain interval of 20 s. After train delivery, IC evoked responses were collected for an additional hour. LTP was calculated as a percentage compared to the mean slope of the field potentials of the entire baseline period prior to the delivery of HFS.

Rats were divided in the following groups: CTA + LTP groups, in which LTP was induced 48 ( $n = 9$ ), 72 ( $n = 7$ ), 96 ( $n = 7$ ) and 120 ( $n = 7$ ) h after CTA-aversion test; pseudo-CTA + LTP groups, in which LTP was induced 48 ( $n = 7$ ), 72 ( $n = 7$ ), 96 ( $n = 6$ ) and 120 ( $n = 8$ ) h after pseudo-training in CTA task (LiCl was substituted

for PBS during the acquisition session). In order to rule out the possibility that LiCl injection produced IC-LTP impairment itself, H<sub>2</sub>O + LTP group ( $n = 7$ ) received LiCl without the novel taste stimulus (saccharin solution) during the CTA acquisition session and 48 h after the aversion test IC-LTP was induced. An additional group (LTP,  $n = 9$ ) received high frequency stimulation in the Bla-IC projection in order to induce LTP without previous CTA training.

Input–output (I/O) curves of the baseline synaptic responses in the Bla-IC pathway were assessed to determine the synaptic strength for a range of stimulation intensities in CTA trained ( $n = 7$ ) and pseudotrained ( $n = 7$ ) rats. I/O curves were assessed 48 h after the aversion test using multiples of threshold intensity (1–10 $\times$ ). Threshold intensity was defined as the stimulation intensity required to produce a 0.10 mV response amplitude.

### 2.4. Intracortical administration of anisomycin

It has been demonstrated that protein-synthesis inhibition in the IC prevents CTA consolidation (Berman & Dudai, 2001; Moguel-González, Gómez-Palacio-Schjetnan, & Escobar, 2008; Rosenblum, Meiri, & Dudai, 1993). Thus, in a second part of our experiments we investigated whether disruption of CTA consolidation due to protein-synthesis inhibition, affects the CTA-dependent modification of IC-LTP induction. Consequently, two additional groups received bilateral and intracortical administration of the protein-synthesis inhibitor anisomycin at a concentration that has been shown to act for 90 min with a 90% of protein-synthesis inhibition (ANI group,  $n = 9$ ; Tocris, Ellisville, MO; 1  $\mu$ l/side; 100  $\mu$ g/ $\mu$ l; 1  $\mu$ l/min; Moguel-González et al., 2008; Rosenblum et al., 1993) or artificial cerebrospinal fluid (ACSF,  $n = 8$ , 1  $\mu$ l/side; 1  $\mu$ l/min) as anisomycin vehicle in the IC. Intracortical infusions were given 20 min before the CTA acquisition session (Moguel-González et al., 2008; Rosenblum et al., 1993). Electrophysiological procedure for IC-LTP was conducted in both groups 48 h after CTA training.

For this purpose, animals from ANI and ACSF groups were implanted bilaterally with 23-gauge stainless steel cannulae under anesthesia (Pentobarbital, 50 ml/kg *i.p.*) using a previously described procedure (Moguel-González et al., 2008). The tips of the guide cannulae were aimed to 2 mm above the IC (Castillo, Figueroa-Guzman, & Escobar, 2006). For both groups, microinjections were delivered through 30-gauge dental needles as microinjectors that extended 2 mm below the previously implanted guide cannulae (reaching the IC area; Fig. 1A). Dental needle microinjectors were attached by polyethylene tubing to a 10  $\mu$ l Hamilton syringe driven by a microinfusion pump (Cole Parmer Co.). Intracortical infusions were given 20 min before the CTA acquisition (Moguel-González et al., 2008). After surgery animals were allowed to recover for 7 days. All groups were histologically analyzed in order to verify the injector tip location and electrode placement.

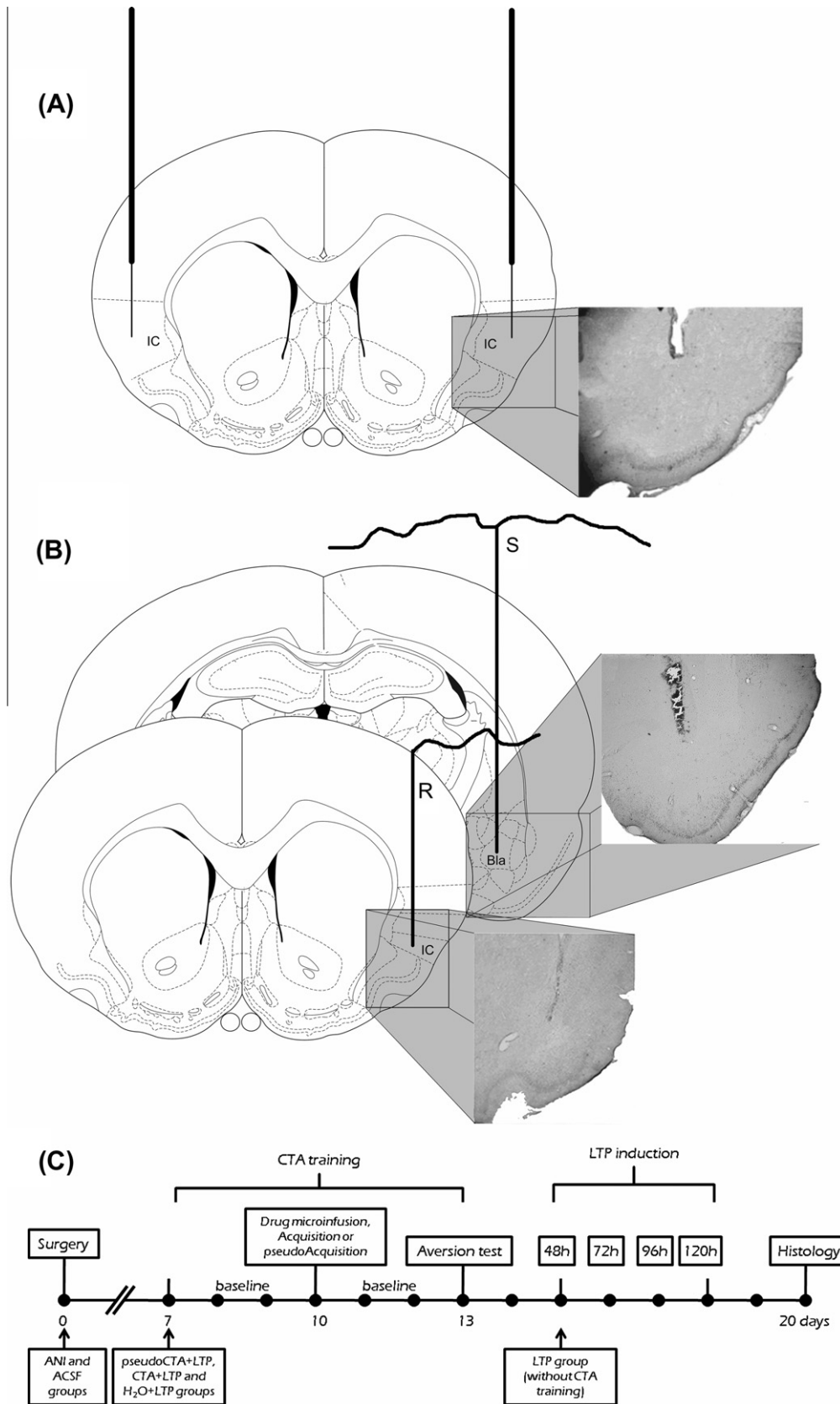
## 3. Results

### 3.1. Histology

Histological examinations revealed that injectors were correctly placed in the IC for the ANI and ACSF groups (Fig. 1A). Similarly, the stimulating and recording electrodes were correctly located in the Bla and agranular IC respectively in all groups (Fig. 1B). Four animals with unclear cannulae or electrode placement were discarded, two of them were from the CTA + LTP group, and the others from the pseudoCTA + LTP120 and LTP groups, respectively.

### 3.2. Conditioned taste aversion

No significant differences were found among groups neither in the baseline water intake nor during the first presentation of the



**Fig. 1.** Schematic representation of the experimental procedure. (A) Diagram and coronal section of the guide cannulae and microinjectors placement in a coronal plane of the IC. (B) Schematic representation and coronal section showing stimulated (S) and recorded (R) sites. Discontinuous lines indicate the boundaries of IC area. (C) Diagram of the experimental procedure. Bla: basolateral amygdaloid nucleus; IC: insular cortex. Scale bar: 1 mm.

conditioned stimulus. The average baseline means ( $\pm$ S.E.M.) of water intake were (in ml)  $16.22 \pm 0.32$ ,  $16.0 \pm 0.57$ ,  $16.14 \pm 0.26$ ,  $16.71 \pm 0.42$ ,  $16.42 \pm 0.48$ ,  $16.62 \pm 0.66$ ,  $15.83 \pm 0.48$ ,  $15.62 \pm 0.26$  and  $17.28 \pm 0.28$ , for each of the CTA + LTP48, CTA + LTP72, CTA + LTP96, CTA + LTP120, pseudoCTA + LTP48, pseudoCTA + LTP72, pseudoCTA + LTP96, pseudoCTA + LTP120 and H<sub>2</sub>O + LTP groups, respectively. Nevertheless, during the aversion test significant differences were found ( $F_{2,62} = 553.53$ ;  $p < 0.001$ ) between the four CTA + LTP and the rest of groups (pseudoCTA + LTP48–120, H<sub>2</sub>O + LTP) (Fig. 2A). CTA + LTP groups by one side and pseudoCTA + LTP groups by the other were pooled because no significant differences were found among them.

### 3.3. Conditioned taste aversion training prevents the IC-LTP induction

The IC field EPSP consisted of  $0.27 \pm 0.05$  mV (mean  $\pm$  S.E.M.) potentials elicited with 50–70  $\mu$ A current intensities and displayed an onset of 2–3 ms and a peak at approximately 7–9 ms, with an average slope of  $0.073 \pm 0.003$  (mean  $\pm$  S.E.M.), in agreement with previous studies (Escobar, Alcocer, et al., 1998; Escobar et al., 2002; Escobar & Bermudez-Rattoni, 2000; Jones et al., 1999).

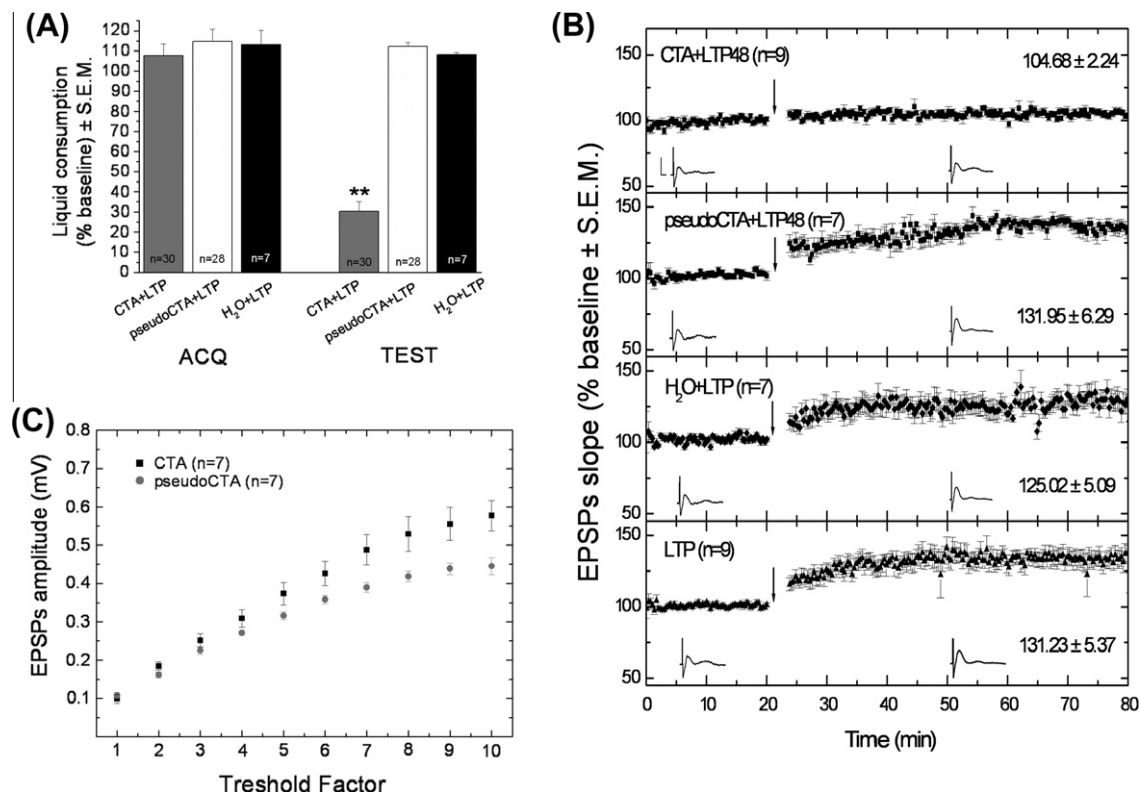
As shown in Fig. 2B, our results show that CTA training prevents the subsequent induction of *in vivo* LTP in the Bla-IC projection at 48 h after the aversion test. Thus, Bla-IC-LTP induction was impaired in CTA + LTP48 group as compared with pseudoCTA + LTP48, H<sub>2</sub>O + LTP and LTP groups. Repeated-measures ANOVA analysis for after tetanus slope increases revealed significant group differences ( $F_{3,28} = 16.80$ ). Post-hoc analysis with Fisher's test, showed significant differences between the CTA + LTP48 group and the other three groups ( $p < 0.001$ ), but the pseudoCTA + LTP48, H<sub>2</sub>O + LTP

and LTP groups were not statistically significant from each other. This result suggests that CTA modifies the Bla-IC projection synaptic properties, which is reflected as a change in the possibility to induce IC-LTP. Neither LiCl nor saccharin when given alone modified IC-LTP induction, showing that taste-malaise association was responsible for the change in the possibility to induce IC-LTP after CTA training.

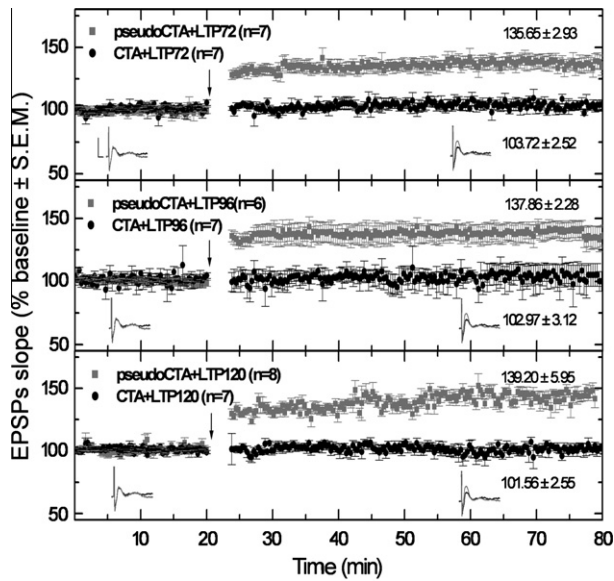
In order to analyze whether CTA-dependent impairment of IC-LTP induction is related with a behavioral-dependent increase in synaptic strength of the Bla-IC pathway, I/O curves were assessed in CTA trained and pseudotrained rats. Non-linear regression analysis of IO relationship revealed significant differences between the CTA and pseudoCTA groups ( $p < 0.001$ ), showing that CTA training modifies the synaptic efficacy of the Bla-IC projection (Fig. 2C). These results suggest that the CTA-dependent modification in the ability to induce IC-LTP is dependent on previous synaptic strengthening of the pathway.

### 3.4. Conditioned taste aversion training prevents the IC-LTP induction for at least 120 h

With the aim to investigate the persistence of the CTA-dependent impairment of IC-LTP induction, we extended the time-window between the CTA-aversion test and the IC-LTP induction protocol to 72, 96 and 120 h. In the CTA + LTP72, 96 and 120 groups, IC-LTP was blocked as compared with pseudoCTA + LTP72, 96 and 120, in which IC-LTP was induced. Repeated-measures ANOVA for slope increases revealed significant group differences ( $F_{5,36} = 18.56$ ). Post-hoc Fisher's test showed significant differences between CTA + LTP and pseudoCTA + LTP groups ( $p < 0.001$ ), but no



**Fig. 2.** CTA training prevents the IC-LTP induction. (A) Liquid consumption during the acquisition session (ACQ) and the aversion test (TEST) for all CTA trained (CTA + LTP) and all CTA-pseudotrained (pseudoCTA + LTP, H<sub>2</sub>O + LTP) groups. (B) Plot of IC evoked responses from CTA + LTP48, pseudoCTA + LTP48, H<sub>2</sub>O + LTP and LTP groups. Note that CTA training blocks LTP induction at the Bla-IC pathway. The bottom of each graph shows representative examples of IC field potentials obtained 10 min before and 60 min after tetanus delivery. Arrows indicate HFS (10 trains 100 Hz/1s/20s intertrain). Inner numbers show the average EPSPs slope (percent of baseline) obtained after tetanus delivery for each group. Scale bar: 10 ms, 0.5 mV. \*\* $p < 0.001$ . (C) Plot of I/O curves for CTA and pseudoCTA groups. Multiples of threshold intensities (1–10) were used. Initial threshold intensities (1) was defined as the stimulation intensities required to produce a 0.10 mV response amplitude.  $p < 0.001$ .



**Fig. 3.** CTA training prevents the IC-LTP induction for at least 120 h after CTA training. Plot of IC evoked responses from the CTA + LTP72, 96 and 120 groups as well as the pseudoCTA + LTP72, 96 and 120, showing that IC-LTP impairment was persistent for at least 120 h after CTA training. Arrows indicate HFS (10 trains 100 Hz/1s/20s intertrain). Inner numbers show the average EPSPs slope (percent of baseline) obtained after tetanus delivery for each group. Scale bar: 10 ms, 0.5 mV. \*\* $p < 0.001$ .

significant differences were found among CTA + LTP groups (Fig. 3). The present results show that the effects elicited by CTA training on IC-LTP are persistent for at least 120 h.

### 3.5. Administration of anisomycin in the IC disrupts CTA consolidation and prevents the CTA-dependent impairment of IC-LTP

It has been shown that anisomycin infusion into the IC disrupts CTA consolidation (Berman & Dudai, 2001; Moguel-González et al., 2008; Rosenblum et al., 1993). To analyze if the disruption of CTA

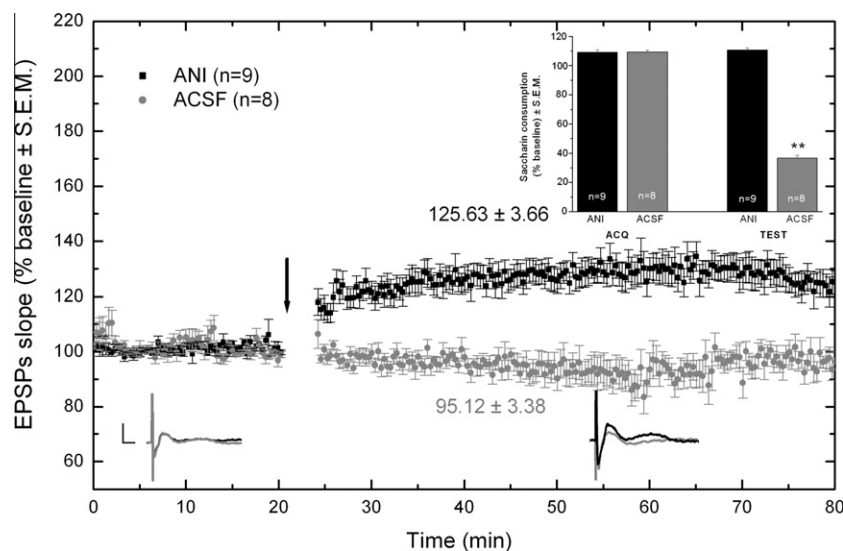
consolidation affects the CTA-dependent impairment of IC-LTP induction, bilateral and intracortical microinfusions of the protein-synthesis inhibitor anisomycin or ACSF (as vehicle) were applied in the IC, 20 min before the CTA acquisition. As shown in Fig. 4, during the retention trial significant differences between ANI and ACSF groups were found ( $F_{1,15} = 152.56$ ,  $p < 0.001$ ). IC-LTP was successfully induced in ANI group as compared with ACSF group (Fig. 3). Repeated-measures ANOVA analysis for slope increases after conditioned tetanus revealed significant differences between the two groups ( $F_{1,15} = 24.06$ ). Post-hoc Fisher's test showed significant differences between ANI and ACSF groups ( $p < 0.001$ ). These results show that both the persistent CTA impairment on IC-LTP and the CTA consolidation, are protein-synthesis dependent.

It is important to note that there are no significant differences in the degree of LTP obtained in all groups. Repeated-measures ANOVA analysis for slope increases after conditioned tetanus revealed no significant differences among the LTP-induced groups (Fig. 5A). On the other hand, Mann-Whitney test showed no significant differences between the magnitude of two time points obtained at 10 and 60 min after tetanus delivery for each of the IC-LTP-induced groups (Fig. 5B), showing that there is no change across the time in LTP magnitude.

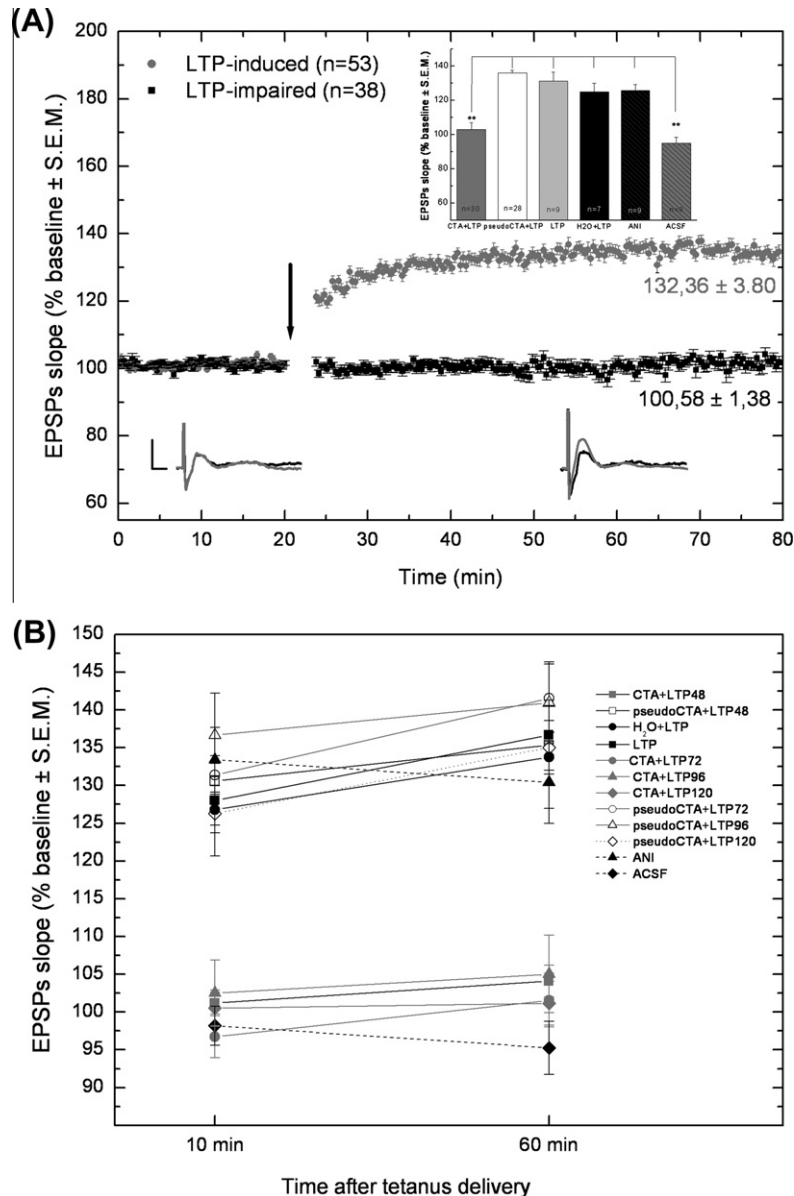
## 4. Discussion

Learning-induced synaptic changes are also accompanied by a modification in the threshold for further synaptic plasticity (Abraham, 2008; Quinlan, Lebel, Brosh, & Barkai, 2004). In the present study we show that CTA training prevents the subsequent induction of *in vivo* IC-LTP for at least 5 days after the aversion test. Additionally, we found that saccharin-LiCl association was responsible for the change in the possibility to induce IC-LTP after CTA training, suggesting that the impairment of IC-LTP was related with the long-term storage of taste aversion memory.

Previous studies have demonstrated that behavioral-training can induce synaptic facilitation (Cooke & Bear, 2010; McKernan & Shinnick-Gallagher, 1997; Rioult-Pedotti, Friedman, & Donoghue, 2000; Rogan, Staubli, & LeDoux, 1997) and this facilitation can be observed through a modulation of the I/O relationship (Rioult-Pedotti, Donoghue,



**Fig. 4.** Bilateral administration of anisomycin in the IC disrupts CTA consolidation and reverses the CTA-dependent impairment of IC-LTP. Plot of IC evoked responses from ANI and ACSF groups. The bottom of the graph shows representative examples of IC field potentials obtained 10 min before and 60 min after tetanus delivery. The upper right corner shows the bar plot of saccharin consumption during the acquisition session (ACQ) and the aversion test (TEST) for ANI and ACSF groups. Arrow indicates HFS (10 trains 100 Hz/1s/20s intertrain). Inner numbers show the average EPSPs slope (percent of baseline) obtained after tetanus delivery for each group. \*\* $p < 0.001$ . Scale bar: 10 ms, 0.5 mV.



**Fig. 5.** Summarize of the LTP-induced and LTP-impaired groups. (A) Plot of IC evoked responses, summarizing all LTP-induced (pseudoCTA + LTP, H<sub>2</sub>O + LTP and ANI) as well as LTP-impaired (CTA + LTP and ACSF) groups. The bottom of the graph shows representative examples of IC field potentials obtained 10 min before and 60 min after tetanus delivery. The upper right corner shows the bar plot of the average EPSPs slope (percent of baseline) obtained after tetanus delivery for each of the CTA + LTP (gray), pseudoCTA + LTP (white), LTP (light gray), H<sub>2</sub>O + LTP (black), ANI (striped black) and ACSF (striped gray) groups. Arrow indicates HFS (10 trains 100 Hz/1s/20s intertrain). Inner numbers show the average of the EPSPs slope (percent of baseline) obtained after tetanus delivery for each group.  $**p < 0.001$ . Scale bar: 10 ms, 0.5 mV. (B) Plot of average EPSPs slope (percent of baseline) obtained 10 and 60 min after tetanus delivery showing that there is no change across the time in LTP magnitude.

hue, & Dunaevsky, 2007; Schroeder & Shinnick-Gallagher, 2005). Moreover, it has been reported that behavioral-dependent synaptic facilitation also modifies the ability to induce subsequent LTP in the behavioral-related pathway (Cooke & Bear, 2010; Rioult-Pedotti et al., 2000; Schroeder & Shinnick-Gallagher, 2005). In the present study we found differences between CTA and pseudoCTA trained I/O curves, showing that CTA training modifies the synaptic strength of the Bla–IC projection. These data suggest that the CTA-dependent modification in the ability to induce IC-LTP is dependent on previous synaptic strengthening of the pathway.

It has been shown that amygdala activation modify the subsequent induction of LTP in the neocortex (Akirav & Richter-Levin, 2002; Richter-Levin & Maroun, 2010). In addition, it has been demonstrated that changes in further LTP induction triggered by amygdala-related behaviors can persist for several days. In this regard, a recent study from Schroeder and Shinnick-Gallagher showed that

changes in synaptic strength induced in rats by fear conditioning were evident *in vitro* 10 days after fear conditioning. The synaptic transmission was facilitated and the high frequency stimulation dependent LTP of the cortico-lateral amygdala pathway remained attenuated 10 days following fear conditioning. Additionally, they found that the low-frequency stimulation dependent LTP measured 24 h after fear conditioning was absent 10 days post-training (Schroeder & Shinnick-Gallagher, 2005). In agreement with the above mentioned studies our present results show that Bla–IC pathway activation during CTA modifies the possibility to induce *in vivo* IC-LTP in a persistent manner.

Homeostatic forms of plasticity might provide the global regulation necessary to maintain synaptic strength and plasticity within a functional dynamic range. These forms of plasticity also operate with diverse mechanisms; for example by detecting changes in neuronal firing and scaling excitatory synaptic

strengths up or down while preserving their relative weights (synaptic scaling), by strengthen pre or postsynaptic properties as a compensatory mechanism (synaptic redistribution) or by altering the ability of synapses to undergo subsequent Hebbian modifications (metaplasticity), that is thought to be essential not only to maintain synapses within a dynamic functional range but also to be substantial for the maintenance of a memory-trace (Abbott & Nelson, 2000; Abraham, 2008; Perez-Otaño & Ehlers, 2005). Metaplastic changes modify the threshold for induction of LTP or LTD after the acquisition of a memory task (Abraham, 2008; Richter-Levin & Maroun, 2010; Schroeder & Shinnick-Gallagher, 2005). Indeed, a previous study (Escobar & Bermudez-Rattoni, 2000) showed that IC-LTP enhances CTA retention, suggesting a modulation of the aversive memory-trace. Similarly, a recent study from our laboratory shows that bilateral infusion of brain-derived neurotrophic factor in the IC enhances CTA retention (Castillo & Escobar, 2011; Castillo et al., 2006). Accordingly, the IC-LTP impairment after CTA training reported in the present work can be interpreted as a metaplastic change that modify the ability to induce subsequent synaptic plasticity in the Bla-IC projection.

In the same line of ideas, it has been observed that a repetitive saccharin-LiCl pairing in CTA trained rats increases the saccharin aversion (Mickley et al., 2007). In addition, previous CTA training enhances the aversion index of a second conditioned experience with a new flavor (Wang, Ren, Perez, Silva, & Pena de Ortiz, 2003).

Changes in the production of a specific subset of synaptic proteins constitute one of the most ubiquitous molecular mechanisms for long-term memory formation (Klann & Sweatt, 2008). Indeed, it has been observed that protein translation inhibition impairs CTA consolidation but not acquisition (Berman & Dudai, 2001; Moguel-González et al., 2008; Rosenblum et al., 1993; Serova, Solov'eva, Lagutina, & Obukhova, 1996). Even the inhibition of proteins that regulate protein translation as the mammalian target of rapamycin (mTOR) can inhibit the CTA consolidation (Belelovsky, Kaphzan, Elkobi, & Rosenblum, 2009). Here we show that microinfusion of anisomycin at a concentration that has been shown to act for 90 min with a 90% of protein-synthesis inhibition (Berman & Dudai, 2001; Moguel-González et al., 2008; Rosenblum et al., 1993) impairs CTA consolidation and prevents the IC-LTP modification after this task. Despite the fact that protein-synthesis role in metaplasticity is unclear (Abraham, 2008; Antonov, Kandel, & Hawkins, 2010), it has been suggested that protein-synthesis raises the threshold to revert synaptic plasticity (Abraham, 2008). Our results show that the changes in protein-synthesis triggered after CTA training were crucial in the formation of behavioral-dependent modifications on IC plastic properties.

In summary, our results show that CTA training triggers a persistent impairment in the ability to induce *in vivo* LTP in the IC, a neocortical area that has been implicated in the acquisition and storage of aversive memories. The present results provide evidence that CTA modulates long-lasting changes in IC synaptic strength, suggesting that changes in the ability to induce subsequent synaptic plasticity contribute to the formation and persistence of aversive memories.

## Acknowledgments

This research was supported by PAPIIT IN213210 and CONACYT 60851.

## References

- Abbott, L. F., & Nelson, S. B. (2000). Synaptic plasticity: taming the beast. *Nature Neuroscience*(Suppl. 3), 1178–1183.
- Abraham, W. C. (2008). Metaplasticity: Tuning synapses and networks for plasticity. *Nature Reviews Neuroscience*, 9, 387–399.
- Akirav, I., & Richter-Levin, G. (2002). Mechanisms of amygdala modulation of hippocampal plasticity. *Journal of Neuroscience*, 22, 9912–9921.
- Antonov, I., Kandel, E. R., & Hawkins, R. D. (2010). Presynaptic and postsynaptic mechanisms of synaptic plasticity and metaplasticity during intermediate-term memory formation in *Aplysia*. *Journal of Neuroscience*, 30, 5781–5791.
- Belelovsky, K., Kaphzan, H., Elkobi, A., & Rosenblum, K. (2009). Biphasic activation of the mTOR pathway in the gustatory cortex is correlated with and necessary for taste learning. *Journal of Neuroscience*, 29, 7424–7431.
- Berman, D. E., & Dudai, Y. (2001). Memory extinction, learning anew, and learning the new: Dissociations in the molecular machinery of learning in cortex. *Science*, 291, 2417–2419.
- Bernstein, I. L., & Koh, M. T. (2007). Molecular signaling during taste aversion learning. *Chemical Senses*, 32, 99–103.
- Bertrand, D., Yannick, S., Mathilde, B., Frederic, L., Nadine, R., & Guillaume, F. (2009). Critical role of insular cortex in taste but not odour aversion memory. *European Journal of Neuroscience*, 29, 1654–1662.
- Castillo, D. V., & Escobar, M. L. (2011). A role for MAPK and PI-3K signaling pathways in brain-derived neurotrophic factor modification of conditioned taste aversion retention. *Behavioural Brain Research*, 217, 248–252.
- Castillo, D. V., Figueroa-Guzman, Y., & Escobar, M. L. (2006). Brain-derived neurotrophic factor enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Research*, 1067, 250–255.
- Castro-Alamancos, M. A., & Connors, B. W. (1996). Short-term synaptic enhancement and long-term potentiation in neocortex. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, 93, 1335–1339.
- Cooke, S. F., & Bear, M. F. (2010). Visual experience induces long-term potentiation in the primary visual cortex. *Journal of Neuroscience*, 30, 16304–16313.
- Escobar, M. L., Alcocer, I., & Bermudez-Rattoni, F. (2002). In vivo effects of intracortical administration of NMDA and metabotropic glutamate receptors antagonists on neocortical long-term potentiation and conditioned taste aversion. *Behavioural Brain Research*, 129, 101–106.
- Escobar, M. L., Alcocer, I., & Chao, V. (1998). 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., & Bermudez-Rattoni, F. (2000). Long-term potentiation in the insular cortex enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Research*, 852, 208–212.
- Escobar, M. L., Chao, V., & Bermudez-Rattoni, F. (1998). In vivo long-term potentiation in the insular cortex: NMDA receptor dependence. *Brain Research*, 779, 314–319.
- Hirata, R., Matsumoto, M., Judo, C., Yamaguchi, T., Izumi, T., Yoshioka, M., et al. (2009). Possible relationship between the stress-induced synaptic response and metaplasticity in the hippocampal CA1 field of freely moving rats. *Synapse*, 63, 549–556.
- Jones, M. W., French, P. J., Bliss, T. V., & Rosenblum, K. (1999). Molecular mechanisms of long-term potentiation in the insular cortex in vivo. *Journal of Neuroscience*, 19, 1–8, RC36.
- Kanter, E. D., & Haberly, L. B. (1993). Associative long-term potentiation in piriform cortex slices requires GABAA blockade. *Journal of Neuroscience*, 13, 2477–2482.
- Kirkwood, A., & Bear, M. F. (1994). Hebbian synapses in visual cortex. *Journal of Neuroscience*, 14, 1634–1645.
- Klann, E., & Sweatt, J. D. (2008). Altered protein synthesis is a trigger for long-term memory formation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 89, 247–259.
- Luhmann, H. J., & Prince, D. A. (1990). Transient expression of polysynaptic NMDA receptor-mediated activity during neocortical development. *Neuroscience Letters*, 111, 109–115.
- McKernan, M. G., & Shinnick-Gallagher, P. (1997). Fear conditioning induces a lasting potentiation of synaptic currents in vitro. *Nature*, 390, 607–611.
- Mickley, G. A., Hoxha, Z., Bacik, S., Kenmuir, C. L., Wellman, J. A., Biada, J. M., et al. (2007). Spontaneous recovery of a conditioned taste aversion differentially alters extinction-induced changes in c-Fos protein expression in rat amygdala and neocortex. *Brain Research*, 1152, 139–157.
- Moguel-González, M. G., Gómez-Palacio-Schjetman, A., & Escobar, M. L. (2008). BDNF reverses the CTA memory deficits produced by inhibition of protein synthesis. *Neurobiology of Learning and Memory*, 90, 584–587.
- Paxinos, G., & Watson, C. (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (6th ed.). San Diego: Academic Press.
- Perez-Otaño, I., & Ehlers, M. D. (2005). Homeostatic plasticity and NMDA receptor trafficking. *Trends in Neurosciences*, 28, 229–238.
- Quinlan, E. M., Lebel, D., Brosh, I., & Barkai, E. (2004). A molecular mechanism for stabilization of learning-induced synaptic modifications. *Neuron*, 41, 185–192.
- Racine, R. J., Wilson, D., Teskey, G. C., & Milgram, N. W. (1994). Post-activation potentiation in the neocortex: I. Acute preparations. *Brain Research*, 637, 73–82.
- Richter-Levin, G., & Maroun, M. (2010). Stress and amygdala suppression of metaplasticity in the medial prefrontal cortex. *Cerebral Cortex*, 20, 2433–2441.
- Riout-Pedotti, M. S., Donoghue, J. P., & Dunaevsky, A. (2007). Plasticity of the synaptic modification range. *Journal of Neurophysiology*, 98, 3688–3695.
- Riout-Pedotti, M. S., Friedman, D., & Donoghue, J. P. (2000). Learning-induced LTP in neocortex. *Science*, 290, 533–536.
- Rogan, M. T., Staubli, U. V., & LeDoux, J. E. (1997). Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature*, 390, 604–607.
- Rosenblum, K., Meiri, N., & Dudai, Y. (1993). Taste memory: The role of protein synthesis in gustatory cortex. *Behavioral Neural Biology*, 59, 49–56.

- Rudy, J. W., & Matus-Amat, P. (2009). DHPG activation of group 1 mGluRs in BLA enhances fear conditioning. *Learning and Memory*, 16, 421–425.
- Schroeder, B. W., & Shinnick-Gallagher, P. (2005). Fear learning induces persistent facilitation of amygdala synaptic transmission. *European Journal of Neuroscience*, 22, 1775–1783.
- Serova, O. N., Solov'eva, N. A., Lagutina, L. V., & Obukhova, M. F. (1996). Formation of taste aversion and preference in protein synthesis inhibition in rats. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 26, 477–481.
- Turrigiano, G. (2007). Homeostatic signaling: the positive side of negative feedback. *Current Opinion in Neurobiology*, 17, 318–324.
- Wang, J., Ren, K., Perez, J., Silva, A. J., & Pena de Ortiz, S. (2003). The antimetabolite ara-CTP blocks long-term memory of conditioned taste aversion. *Learning and Memory*, 10, 503–509.
- Werk, C. M., & Chapman, C. A. (2003). Long-term potentiation of polysynaptic responses in layer V of the sensorimotor cortex induced by theta-patterned tetanization in the awake rat. *Cerebral Cortex*, 13, 500–507.
- Xu, Z., Chen, R. Q., Gu, Q. H., Yan, J. Z., Wang, S. H., Liu, S. Y., et al. (2009). Metaplastic regulation of long-term potentiation/long-term depression threshold by activity-dependent changes of NR2A/NR2B ratio. *Journal of Neuroscience*, 29, 8764–8773.

## **11. ANEXO 2**

El anexo 2 es el segundo artículo que complementa los hallazgos del proyecto de investigación que se presenta en esta tesis, el cual será enviado próximamente para su publicación. Específicamente muestra que el bloqueo de los receptores NMDA y la inhibición de la PKC, pero no de la PKA, evitan el efecto del CAS sobre la inducción subsecuente de LTP en la CI.



# Differential role of PKC, PKA, and NMDA receptors in the CTA-dependent modification of in vivo IC-LTP

Rodríguez-Durán L. F.<sup>1</sup> and Escobar M. L.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>División de Investigación y Estudios de Posgrado, Facultad de Psicología, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México

## Abstract

It has been proposed that metaplasticity, an activity-dependent modulation of subsequent synaptic plasticity, contributes to learning and memory processes. In particular, training in several behavioral tasks modifies the possibility to induce long-term potentiation (LTP). Unfortunately, the mechanisms underlying behavioral-induced metaplastic changes remain unclear. Synaptic activity induces the activation of N-Methyl-D-aspartate (NMDA) receptor, which leads to calcium entry into neuronal cells, and an increase in calcium levels activates protein kinases as PKA and PKC, which contributes significantly to the formation of different types of behavioral-memories, as well as to the expression of LTP. Our previous studies in the insular cortex (IC), a region of the temporal cortex implicated in acquisition and retention of conditioned taste aversion (CTA), have demonstrated that induction of LTP in the basolateral amygdaloid nucleus (BLA)-IC projection previous to CTA training enhances the retention of this task. Furthermore, recently it has been showed that CTA training produces a change in the ability to induce subsequent synaptic plasticity on the mentioned pathway. Interestingly, protein synthesis inhibition in the IC blocks CTA consolidation as well as impairs the CTA-induced modification in the ability to express subsequent IC-LTP. However, if the CTA effect on IC-LTP is dependent on NMDA receptors, PKA and PKC remains unexplored. The aim of the present study was to investigate the participation of PKC and PKA activation on the CTA-dependent modification of the IC-LTP threshold. Thus, CTA-trained rats received high frequency stimulation in the Bla-IC projection in order to induce LTP 48 hours after the aversion test. The NMDA-receptor antagonist CPP and the specific inhibitors for PKC (cheliritrine) and PKA (KT-5720) were intracortically administered in the acquisition session. We observed that the blockade of NMDA-receptor and the inhibition of PKC activity prevent the CTA memory-formation as well as the IC-LTP impairment. Nevertheless, PKA inhibition prevents CTA formation but has no interference with the CTA effects on IC-LTP. Our results show that disruption of CTA formation prevent the CTA effect on IC-LTP, suggesting that the mechanisms responsible for metaplastic changes are part of those underlying CTA memory-trace.

## Introduction

The ability to express synaptic plasticity is dependent upon the activity history of a given neuron or neural network (Bear, 2003; Abraham, 2008). Metaplasticity, an activity dependent change in the possibility to exhibit subsequent synaptic plasticity, is now considered as a key component of the learning and memory processes (Abraham and Bear, 1996; Bear, 1996; Pérez-Otaño and Ehlers, 2005; Abraham, 2008). In particular, It has been observed that acquisition of aversive experiences is accompanied by long-lasting modifications in the ability to undergo further synaptic plasticity (Schroeder and Shinnick-Gallagher, 2004; Hong et al., 2011; Rodríguez-Duran et al., 2011). In the same order of ideas, it has been

demonstrated that training in several learning tasks trigger different molecular mechanisms which are related with metaplasticity, as an increase of after hyperpolarization (AHP) currents, a persistent increase in the protein kinases C (PKC) and A (PKA) as well as a regulation of mGlu receptors (Saar et al., 1998; Zelcer et al., 2006; Abraham, 2008). In addition, it has been demonstrated that learning tasks can modify the requirement of N-Methyl-D-aspartate (NMDA) receptor for a second learning (Tyler et al., 2007; Wiltgen et al., 2011) and the NMDA receptor subunit proportions (Quinlan et al., 2004). However, the learning-induced molecular mechanisms related with metaplasticity are still uncertain.

The insular cortex (IC) is a region of the temporal cortex in the rat that

has been implicated in the acquisition and storage of different aversive-motivated learning tasks, like conditioned taste aversion (CTA). CTA is a very robust and widely used model for the study of learning and memory processes in which an animal acquires aversion to a novel taste when it is followed by digestive malaise (Bernstein and Koh, 2007; Desgranges et al., 2009). Long-term potentiation (LTP) is a long-lasting and activity-dependent increase in synaptic efficacy (Abraham, 2008; Citri and Malenka, 2008), that is widely expressed in several neocortical areas including IC, specifically in the projection from the basolateral amygdaloid nucleus (Bla) to the agranular IC (Escobar et al., 1998a; Escobar et al., 1998b; Jones et al., 1999). IC-LTP and CTA have similar molecular mechanisms, such as N-Methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-dependence (Escobar et al., 1998a; Escobar et al., 2002), activation of ERK1/2 and immediately early genes expression (Jones et al., 1999) In addition, the activity of protein kinases that has been related with the formation of LTP in several brain areas, as the protein kinase A (PKA) and the protein kinase C (PKC), are also related to the CTA memory formation in the IC (Miranda and McGaugh, 2004; Miranda et al., 2008).

In our previous studies we showed that pharmacological and electrophysiological-induced IC-LTP previous to CTA training enhanced the retention of this task (Escobar and Bermudez-Rattoni, 2000; Castillo et al., 2006). In addition, in a recent study we demonstrated that CTA training modifies the ability to induce subsequent IC-LTP

(Rodriguez-Duran et al., 2011), which is related to an increase in synaptic excitability. Interestingly, we found that protein synthesis inhibition with anisomycin in the insular cortex impairs CTA training as well as prevents the CTA effect on IC-LTP, suggesting that the long-lasting CTA memory trace and the persistent metaplastic effect of CTA on IC-LTP are both consolidated together (Rodriguez-Duran et al., 2011). CTA memory processes is sensible to be interrupted in different stages of memory. Specifically, CTA memory can be interrupted with inhibitors of NMDA receptor, which has been proposed as a gate of the information acquisition (Daw et al., 1993; Escobar et al., 1998a), with inhibitors of protein kinases, proposed to play an important role in the integration of extracellular stimuli regulating gene expression (Ahi et al., 2004; Nunez-Jaramillo et al., 2007) and with inhibitors of protein synthesis, which are associated with the consolidation of long term memory (Rosenblum et al., 1993; Berman and Dudai, 2001; Moguel-Gonzalez et al., 2008). Whether the CTA effect on IC-LTP dependent on the activity of NMDA receptor, PKA and PKC remains unclear. Thus, the aim of the present study was to analyze whether the intracortical microinfusion of an NMDA receptor antagonist and specific inhibitors for PKC and PKA in the IC affect the CTA effect on IC-LTP.

## Materials and methods

A total of 47 male Wistar rats weighting 350-380 g were prepared for our experiments. They were housed individually under a 12/12-h light–dark cycle, with food and water *ad libitum* (except where indicated)

and an average room temperature of 22 °C.

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

A previously described experimental procedure for CTA was used (Escobar et al., 1998a; Escobar and Bermudez-Rattoni, 2000; Escobar et al., 2002). Briefly, rats were deprived of water for 24 hours and then habituated to drink water from a single graduated cylinder twice a day, during ten minutes trials for three days. On the acquisition day, water was substituted for saccharin solution 0.1% (Sigma, St. Louis, MO), and 10 minutes later, the animals received 7.5 ml/kg i.p. of a 0.15 M solution of LiCl, which induces digestive malaise. After three more days of baseline consumption, water was substituted newly by a 0.1% saccharin solution to test the aversion. The reduction of saccharin consumption with respect

to baseline intake was used as a measure of strength of aversion.

Electrophysiological recordings were performed 48 hours after the aversion tests in all groups as previously described (Escobar et al., 1998a; Escobar and Bermudez-Rattoni, 2000; Escobar et al., 2002). Briefly, rats were anesthetized with pentobarbital (50 mg/kg i.p.). IC responses were recorded unilaterally by using a monopolar stainless steel electrode 0.005 inches diameter. Constant current stimulation (50–70 µA monophasic pulses, 0.25 ms duration) was provided via direct and unilateral stimulation of the Bla by using a stainless steel bipolar electrode. Bla and IC electrodes were aimed at the following stereotaxic coordinates: AP +1.2 mm, ML 5.5 mm, DV –5.5 mm ± 0.2 and AP –2.8 mm, ML –5.0 mm, DV -8.5 mm ± 0.2, respectively (Paxinos and Watson, 2007). The current intensity used was sufficient to evoke 50% of the maximal Bla-IC response. IC-evoked responses were measured by obtaining the field excitatory postsynaptic potential (EPSP) slope measured 1–3 ms after the EPSP onset. Low-frequency responses were evoked once every 20 sec throughout a 20 min baseline period. LTP was induced by delivering 10 trains of 100 Hz/1 sec with an intertrain interval of 20 sec. After train delivery, IC evoked responses were collected for an additional hour. LTP was calculated as a percentage of change with respect to the mean slope of field potentials before tetanization.

With the aim to investigate part of the mechanisms related with the CTA-dependent modification of IC-LTP, rats were divided in the following groups: CPP group (n=4),

which receives an intracortical microinfusion of the NMDAR antagonist 3-(2-Carboxypiperazin-4-yl)propyl-1-phosphonic acid (CPP; 0.5  $\mu$ l/side; 10  $\mu$ g/ $\mu$ l; 0.5  $\mu$ l/min; Tocris, Ellisville, MO) and a control group (VehCPP; n=4) which received an intracortical microinfusion of PBS as vehicle (0.5  $\mu$ l/side; 0.5  $\mu$ l/min); CHE group, (n=5) which received an intracortical microinfusion of the PKC inhibitor chelerytrine (1  $\mu$ l/side; 3.83  $\mu$ g/ $\mu$ l; 1 $\mu$ l/min; Alomone Labs, Jerusalem, Israel) and a control group (VehCH; n=4), which received an intracortical microinfusion of saline solution as vehicle (NaCl 9%; 1  $\mu$ l/side; 1  $\mu$ l/min); KT group (n=8), which received an intracortical microinfusion of KT5720 (1  $\mu$ l/side; 1  $\mu$ g/ $\mu$ l ;1  $\mu$ l/min Alomone Labs, Jerusalem, Israel) and a control group (VehKT; n=5), which received an intracortical microinfusion of saline solution as vehicle (NaCl 9%; 1  $\mu$ l/side; 1  $\mu$ l/min). Infusions were performed 30 minutes before saccharin consumption for the CPP and VehCPP and 10 minutes before saccharin consumption for the CHE, VehCHE, KT and VehKT groups. All groups were histologically analyzed in order to verify the injector tip location and electrode placement.

## Results

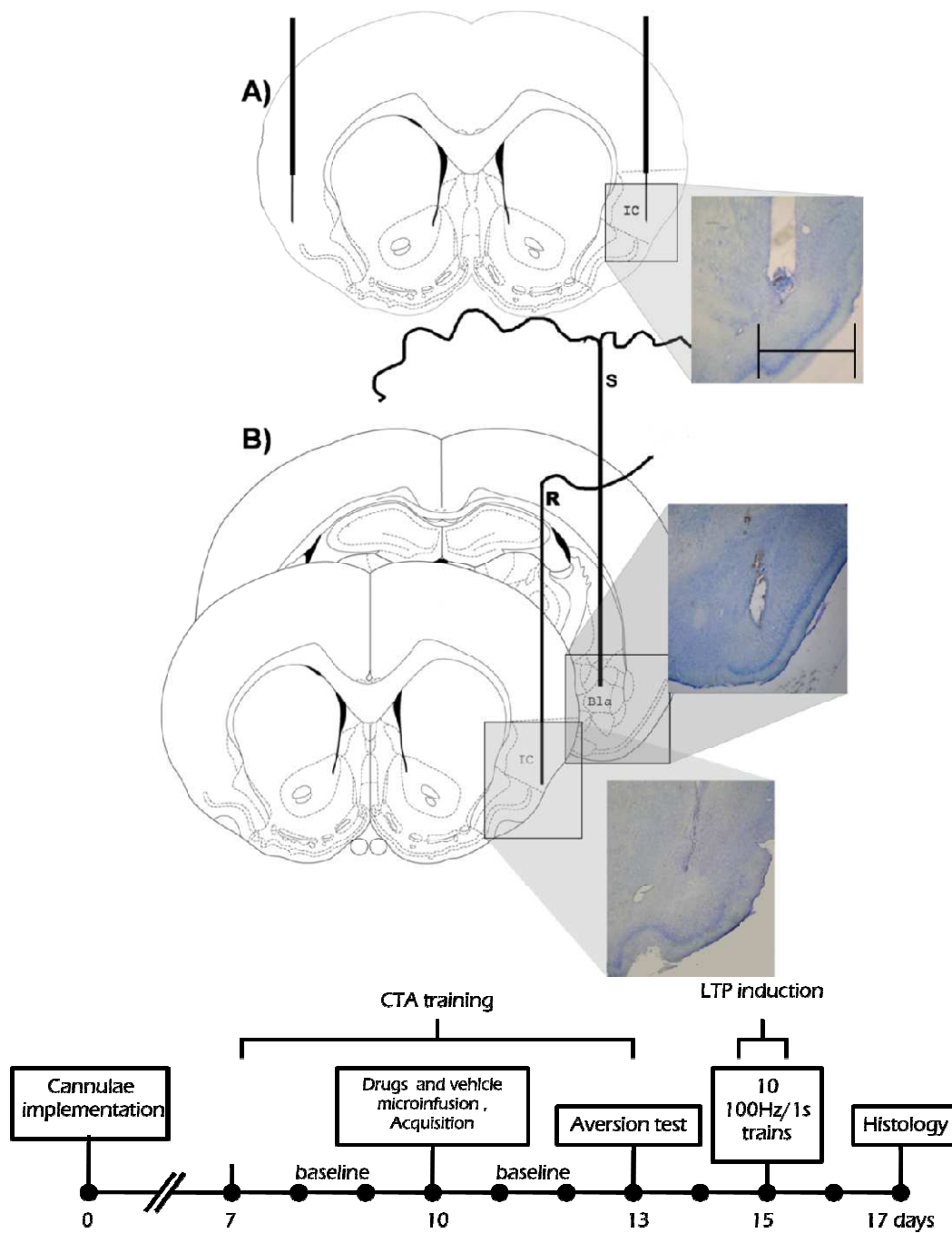
Histological examinations revealed that injectors were correctly placed in the IC for the ANI and ACSF groups (Fig. 1A). Similarly, the stimulating and recording electrodes were correctly located in the Bla and agranular IC respectively in all groups (Fig. 1B). Two animals with unclear cannulae or electrode placement were discarded, one of them were from the KT group, and

the other one from the VehCPP group.

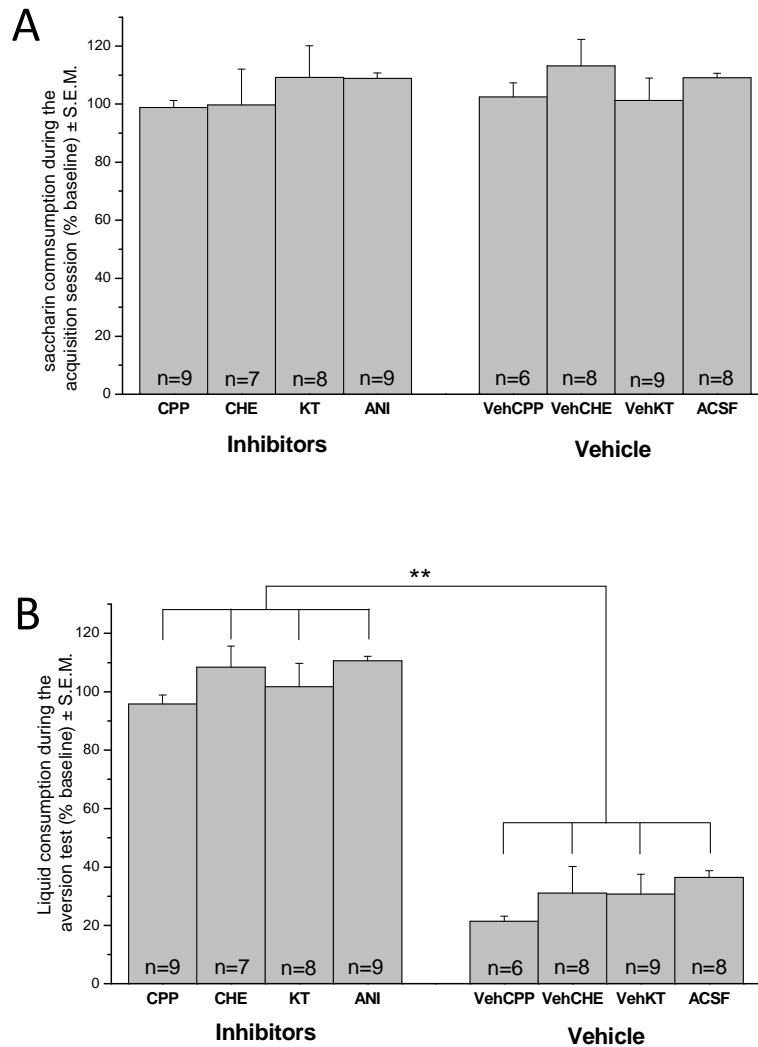
No significant differences were found among groups neither in the baseline water intake nor during the acquisition session for all groups (Fig. 2A). The average baseline means ( $\pm$  S.E.M.) of water intake were (in ml): 16.41  $\pm$  2.36, 15,197  $\pm$  1.32, 17.65  $\pm$  2.56, 16.85  $\pm$  2.75, 15.77  $\pm$  3.47 and 16.76  $\pm$  2.92 for each of the CPP, VehCPP, CHE, VehCH, KT and VehKT groups, respectively. Nevertheless, during the aversion test significant differences were found ( $F_{5,41} = 523.19$ ;  $p < 0.001$ ) between the CPP, CHE and KT groups and its respective control groups (VehCPP, VehCH and VehKT, respectively; Fig. 2B).

The IC field EPSP consisted of 0.30  $\pm$  0.09 mV (mean  $\pm$  S.E.M.) potentials elicited with 50–70  $\mu$ A current intensities and displayed an onset of 2–3 ms and a peak at approximately 7–9 ms, with an average slope of 0.087  $\pm$  0.003 (mean  $\pm$  S.E.M.), in agreement with previous studies (Escobar et al., 1998a; Jones et al., 1999; Escobar and Bermudez-Rattoni, 2000; Escobar et al., 2002).

As can be observed in figure 3, inhibition of NMDAR and PKC in the IC during the acquisition of CTA, impair the ability to induce IC-LTP. Repeated-measures ANOVA analysis for after-tetanus slope EPSPs revealed significant group differences ( $F_{3,26} = 32.92$ ;  $p < 0.001$ ) for the CPP, VehCPP, CHE, VehCH



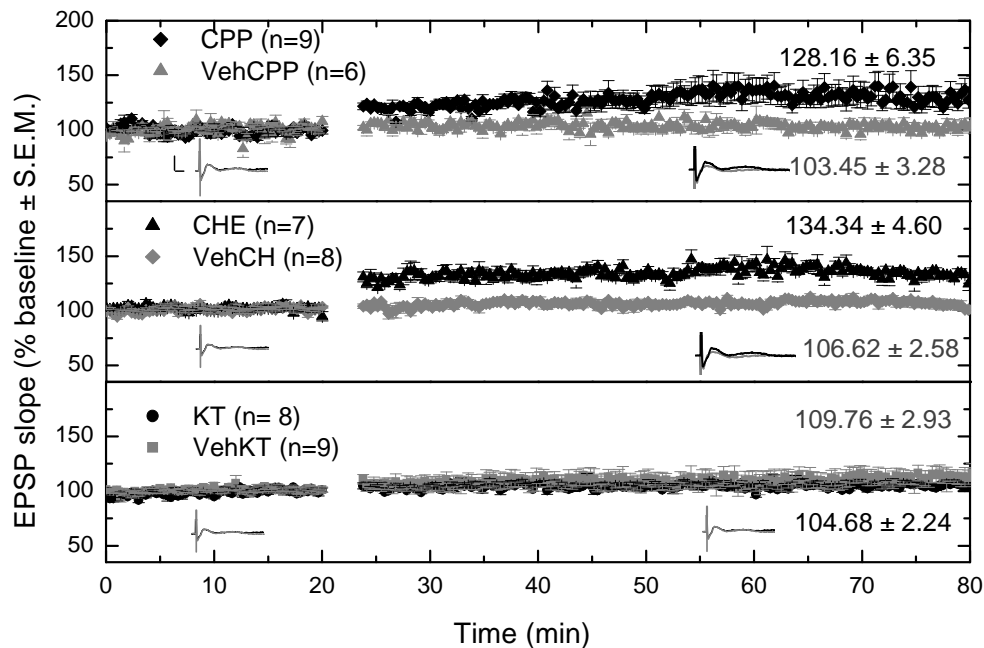
**Figure 1. Schematic representation of the experimental procedure. (A)** Schematic diagram of the guide cannulae and microinjector placement in a coronal plane of the IC. **(B)** Schematic representation and coronal section showing stimulated (S) and recorded (R) sites. Discontinuous lines indicate the boundaries of IC area. **(C)** Diagram of the experimental procedures. Bla: basolateral amygdaloid nucleus; IC: insular cortex. Scale bar: 1 mm.



**Figure 2. Block of NMDA receptor as well as PKA and PKC inhibition in the IC impair CTA. (A)** Mean  $\pm$  S.E.M. of saccharin consumption (percent of baseline) during acquisition session for the CPP, VehCPP, CHE, VheCH, KT and VehKT groups **(B)** Mean  $\pm$  S.E.M. of saccharin consumption (percent of baseline) during aversion test for the mentioned groups. Only those groups which receive vehicle microinfusion in the IC show a reduction of saccharin consumption with respect to baseline intake. \*\* =  $p < 0.001$ .

groups. Post-hoc analysis with Fisher's test showed significant differences between the CPP and CHE groups with their respective control groups VehCPP and VheCH ( $p < 0.001$ ). These results show that both the persistent CTA impairment on IC-LTP and the CTA formation are NMDA and PKC-dependent.

Interestingly, despite the fact that PKA inhibition impair the CTA memory, we found that the CTA-dependent impairment of IC-LTP was unaffected by KT-5720. Repeated-measures ANOVA analysis for slope increases after conditioned tetanus revealed no significant differences between the two KT and VehKT groups. These



**Figure 3. Bilateral administration of NMDA receptor antagonist and PKC but no PKA inhibitor, reverses the CTA-dependent impairment of IC-LTP.** Graphic shows the percentage of baseline of EPSP slope after conditioning tetanus for the CPP, VehCPP, CHE, VehCH, KT and VehKT groups. Bottom traces show representative examples of EPSPs responses from IC 10 minutes before and 60 minutes after the delivery of conditioning train (arrow). Scale bar: 10 ms, 0.5 mV.

results show that the IC-LTP impairment due to CTA training is independent on PKA.

## Discussion

Learning and memory processes induce molecular changes which are reflected in modifications on synaptic properties (Citri and Malenka, 2008). It has been demonstrated that learning tasks induce enhancements in synaptic efficacy as well as changes on the ability to induce subsequent synaptic plasticity or metaplasticity (Rioult-Pedotti et al., 2000; Schroeder and Shinnick-Gallagher, 2004; Hong et al., 2011; Rodriguez-

Duran et al., 2011). However, if the synaptic proteins that participate in the formation of learning and memory are also participating in metaplasticity remains unclear. In the present study we show that the pharmacological inhibition of the NMDA receptor and PKC inhibit the CTA training impairment due to this task. These findings provide evidence that CTA training produces a persistent change in the ability to induce subsequent synaptic plasticity on the BLA-IC pathway in a NMDA receptor and PKC dependent manner, proposing that that behavior modulates long-lasting changes in synaptic strength

through a NMDA receptor and PKC-dependent process.

The ionotropic glutamatergic NMDA receptor is now considered to play a crucial role in synaptic plasticity induction (Voglis and Tavernarakis, 2006; Citri and Malenka, 2008). It has been reported that these receptors are involved in several forms of synaptic plasticity expressions (Malenka and Bear, 2004; MacDonald et al., 2006; Citri and Malenka, 2008; Molnar, 2011) as well as in the formation of several learning tasks as the CTA (Escobar et al., 1998a; Bermúdez-Rattoni, 2004).

NMDA receptors also play a crucial role in different homeostatic plasticity expressions as synaptic scaling and metaplasticity (Philpot et al., 2001; Pérez-Otaño and Ehlers, 2005; Turrigiano, 2011). Training in learning tasks promotes NMDA receptor-dependent metaplastic changes in different brain areas as in the hippocampus and in the amygdala (Mockett et al., 2002; Schroeder and Shinnick-Gallagher, 2004; Hong et al., 2011; Rebola et al., 2011). For example, fear conditioning attenuates the subsequent LTP in the lateral amygdala. It has been observed that the mentioned modification was related to a change in the requirement of NMDA receptors for the induction of LTP (Schroeder and Shinnick-Gallagher, 2004), suggesting that learning task modifications in NMDA receptor may lead to metaplasticity. Our present

results show that pharmacological impairment of CTA due to microinfusion of NMDA receptor inhibitors prevents the IC-LTP modification after CTA training, showing that this receptor is necessary for the metaplastic modifications observed in the IC.

In a similar manner, we found that PKC inhibition impairs CTA training and blocks the IC-LTP impairment elicited by this task. PKC is a protein kinase activated by phospholipids, diacylglycerol, arachidonic acid and calcium (Sacchetti and Bielavska, 1998) and has been considered as essential for the formation of synaptic plasticity (Sacchetti and Bielavska, 1998). It has been reported that PKC inhibition in the IC blocks CTA training, (Nunez-Jaramillo et al., 2007) and we show that CTA effect on IC-LTP is also impaired when this protein is blocked. These findings provide evidence that CTA training produces a persistent change in the ability to induce subsequent synaptic plasticity on the BLA-IC pathway in a PKC and NMDA receptor-dependent manner.

The PKA has been implicated in the establishment of long-term aversive memories (Koh and Bernstein, 2003; Koh et al., 2003). It has been reported that PKA inhibition in the amygdala affects the long-term, but not short-term memory of CTA (Koh et al., 2002). Aversive tasks activate PKA through an increase of glucocorticoids in the IC. Indeed, IC infusion of the cAMP analog 8-Bromo-3',5'-adenosine monophosphate, which activate



PKC, increases the CTA memory (Miranda and McGaugh, 2004). Our present results show that PKA inhibition in the IC blocks CTA training. However, CTA effect on IC-LTP was independent on PKA. In this regard, it has been proposed that changes in the ability to induce subsequent synaptic changes in brain areas as the hippocampus were observed in a cAMP and PKA-dependent manner. PKA activation increases the traffic of  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors (AMPA receptors) to the extrasynaptic membrane as a result of PKA-mediated phosphorylation of ser<sup>845</sup> of the GluR1 subunit (Abraham, 2008). In addition, transcription factor CREB (cAMP response element-binding), which is activated in the ser<sup>133</sup> by PKA, are related with changes in the ability to induce subsequent synaptic plasticity (Barco et al., 2002; Chen et al., 2010). Interestingly, PKA-dependent metaplastic changes, which include changes in the AHP currents, are related with a mGlu receptor form of metaplasticity. This metaplastic changes facilitates both the induction and persistence of subsequent LTP, in contrast to the inhibitory effects of NMDA receptor dependent metaplasticity on LTP (Barco et al., 2002; Abraham, 2008). Our results show that PKA inhibition blocks CTA memory, but do not affects CTA-dependent impairment in IC-LTP.

In summary, our results show that the blockade of NMDA-receptor and the inhibition of PKC activity prevent the CTA memory-formation as well as the CTA training-dependent modification of IC-LTP threshold. Nevertheless, PKA inhibition prevents CTA formation but has no

interference with the CTA effect on IC-LTP, providing evidence that behavior modulates long-lasting changes in synaptic strength through a NMDA receptor and PKC-dependent process. Furthermore, our results suggest that CTA-dependent modification of the IC-LTP threshold was differentially affected by protein kinases, enhancing our understanding of the effects of memory-related changes on synaptic function.

#### REFERENCES

- Abraham, W.C. (2008). Metaplasticity: tuning synapses and networks for plasticity. *Nat Rev Neurosci*.
- Abraham, W.C., and Bear, M.F. (1996). Metaplasticity: the plasticity of synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 19, 126-130.
- Ahi, J., Radulovic, J., and Spiess, J. (2004). The role of hippocampal signaling cascades in consolidation of fear memory. *Behav Brain Res* 149, 17-31.
- Barco, A., Alarcon, J.M., and Kandel, E.R. (2002). Expression of constitutively active CREB protein facilitates the late phase of long-term potentiation by enhancing synaptic capture. *Cell* 108, 689-703.
- Bear, M.F. (1996). A synaptic basis for memory storage in the cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13453-13459.
- Bear, M.F. (2003). Bidirectional synaptic plasticity: from theory to reality. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358, 649-655.
- Berman, D.E., and Dudai, Y. (2001). Memory extinction, learning anew, and learning the new: dissociations in the molecular machinery of learning in cortex. *Science* 291, 2417-2419.

- Bermúdez-Rattoni, F. (2004). Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nat Rev Neurosci* 5, 209-217.
- Bernstein, I.L., and Koh, M.T. (2007). Molecular signaling during taste aversion learning. *Chem Senses* 32, 99-103.
- Castillo, D.V., Figueroa-Guzman, Y., and Escobar, M.L. (2006). Brain-derived neurotrophic factor enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Res* 1067, 250-255.
- Citri, A., and Malenka, R.C. (2008). Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33, 18-41.
- Chen, L., Cai, W., Zhou, R., Furuya, K., and Sokabe, M. (2010). Modulatory metaplasticity induced by pregnenolone sulfate in the rat hippocampus: a leftward shift in LTP/LTD-frequency curve. *Hippocampus* 20, 499-512.
- Daw, N.W., Stein, P.S., and Fox, K. (1993). The role of NMDA receptors in information processing. *Annu Rev Neurosci* 16, 207-222.
- Desgranges, B., Sevelinges, Y., Bonnefond, M., Levy, F., Ravel, N., and Ferreira, G. (2009). Critical role of insular cortex in taste but not odour aversion memory. *Eur J Neurosci* 29, 1654-1662.
- Escobar, M.L., Alcocer, I., and Bermudez-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. *Behav Brain Res* 129, 101-106.
- Escobar, M.L., Alcocer, I., and Chao, V. (1998a). The NMDA receptor antagonist CPP impairs conditioned taste aversion and insular cortex long-term potentiation in vivo. *Brain Res* 812, 246-251.
- Escobar, M.L., and Bermudez-Rattoni, F. (2000). Long-term potentiation in the insular cortex enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Res* 852, 208-212.
- Escobar, M.L., Chao, V., and Bermudez-Rattoni, F. (1998b). In vivo long-term potentiation in the insular cortex: NMDA receptor dependence. *Brain Res* 779, 314-319.
- Hong, I., Kim, J., Lee, J., Park, S., Song, B., An, B., Park, K., Lee, H.W., Lee, S., Kim, H., Park, S.H., Eom, K.D., and Choi, S. (2011). Reversible plasticity of fear memory-encoding amygdala synaptic circuits even after fear memory consolidation. *PLoS One* 6, e24260.
- Jones, M.W., French, P.J., Bliss, T.V., and Rosenblum, K. (1999). Molecular mechanisms of long-term potentiation in the insular cortex in vivo. *J Neurosci* 19, RC36.
- Koh, M.T., and Bernstein, I.L. (2003). Inhibition of protein kinase A activity during conditioned taste aversion retrieval: interference with extinction or reconsolidation of a memory? *Neuroreport* 14, 405-407.
- Koh, M.T., Clarke, S.N., Spray, K.J., Thiele, T.E., and Bernstein, I.L. (2003). Conditioned taste aversion memory and c-Fos induction are disrupted in RIIbeta-protein kinase A mutant mice. *Behav Brain Res* 143, 57-63.
- Koh, M.T., Thiele, T.E., and Bernstein, I.L. (2002). Inhibition of protein kinase A activity interferes with long-term, but not short-term, memory of conditioned taste aversions. *Behav Neurosci* 116, 1070-1074.
- Macdonald, J.F., Jackson, M.F., and Beazely, M.A. (2006). Hippocampal long-term synaptic plasticity and signal amplification of NMDA receptors. *Crit Rev Neurobiol* 18, 71-84.
- Malenka, R.C., and Bear, M.F. (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44, 5-21.

- Miranda, M.I., and Mcgaugh, J.L. (2004). Enhancement of inhibitory avoidance and conditioned taste aversion memory with insular cortex infusions of 8-Br-cAMP: involvement of the basolateral amygdala. *Learn Mem* 11, 312-317.
- Miranda, M.I., Quirarte, G.L., Rodriguez-Garcia, G., Mcgaugh, J.L., and Roozendaal, B. (2008). Glucocorticoids enhance taste aversion memory via actions in the insular cortex and basolateral amygdala. *Learn Mem* 15, 468-476.
- Mockett, B., Coussens, C., and Abraham, W.C. (2002). NMDA receptor-mediated metaplasticity during the induction of long-term depression by low-frequency stimulation. *Eur J Neurosci* 15, 1819-1826.
- Moguel-Gonzalez, M., Gomez-Palacio-Schjetnan, A., and Escobar, M.L. (2008). BDNF reverses the CTA memory deficits produced by inhibition of protein synthesis. *Neurobiol Learn Mem* 90, 584-587.
- Moguel-González, M.G., Gómez-Palacio-Schjetnan, A., and Escobar, M.L. (2008). BDNF reverses the CTA memory deficits produced by inhibition of protein synthesis. *Neurobiol Learn Mem* In Press.
- Molnar, E. (2011). Long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. *Semin Cell Dev Biol*.
- Nunez-Jaramillo, L., Delint-Ramirez, I., and Bermudez-Rattoni, F. (2007). PKC blockade differentially affects aversive but not appetitive gustatory memories. *Brain Res* 1148, 177-182.
- Paxinos, G., and Watson, C. (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego: Academic Press.
- Pérez-Otaño, I., and Ehlers, M.D. (2005). Homeostatic plasticity and NMDA receptor trafficking. *Trends Neurosci* 28, 229-238.
- Philpot, B.D., Sekhar, A.K., Shouval, H.Z., and Bear, M.F. (2001). Visual experience and deprivation bidirectionally modify the composition and function of NMDA receptors in visual cortex. *Neuron* 29, 157-169.
- Quinlan, E.M., Lebel, D., Brosh, I., and Barkai, E. (2004). A molecular mechanism for stabilization of learning-induced synaptic modifications. *Neuron* 41, 185-192.
- Rebola, N., Carta, M., Lanore, F., Blanchet, C., and Mulle, C. (2011). NMDA receptor-dependent metaplasticity at hippocampal mossy fiber synapses. *Nat Neurosci* 14, 691-693.
- Riout-Pedotti, M.S., Friedman, D., and Donoghue, J.P. (2000). Learning-induced LTP in neocortex. *Science* 290, 533-536.
- Rodriguez-Duran, L.F., Castillo, D.V., Moguel-Gonzalez, M., and Escobar, M.L. (2011). Conditioned taste aversion modifies persistently the subsequent induction of neocortical long-term potentiation in vivo. *Neurobiol Learn Mem* 95, 519-526.
- Rosenblum, K., Meiri, N., and Dudai, Y. (1993). Taste memory: the role of protein synthesis in gustatory cortex. *Behav Neural Biol* 59, 49-56.
- Saar, D., Grossman, Y., and Barkai, E. (1998). Reduced after-hyperpolarization in rat piriform cortex pyramidal neurons is associated with increased learning capability during operant conditioning. *Eur J Neurosci* 10, 1518-1523.
- Sacchetti, B., and Bielavska, E. (1998). Chelerythrine, a specific PKC inhibitor, blocks acquisition but not consolidation and retrieval of conditioned taste aversion in rat. *Brain Res* 799, 84-90.
- Schroeder, B.W., and Shinnick-Gallagher, P. (2004). Fear memories induce a switch in stimulus response and signaling mechanisms for long-term potentiation in the lateral amygdala. *Eur J Neurosci* 20, 549-556.

- Turrigiano, G. (2011). Too many cooks? Intrinsic and synaptic homeostatic mechanisms in cortical circuit refinement. *Annu Rev Neurosci* 34, 89-103.
- Tyler, W.J., Petzold, G.C., Pal, S.K., and Murthy, V.N. (2007). Experience-dependent modification of primary sensory synapses in the mammalian olfactory bulb. *J Neurosci* 27, 9427-9438.
- Voglis, G., and Tavernarakis, N. (2006). The role of synaptic ion channels in synaptic plasticity. *EMBO Rep* 7, 1104-1110.
- Wiltgen, B.J., Wood, A.N., and Levy, B. (2011). The cellular mechanisms of memory are modified by experience. *Learning & Memory* 18, 747-750.
- Zelcer, I., Cohen, H., Richter-Levin, G., Lebiosn, T., Grossberger, T., and Barkai, E. (2006). A cellular correlate of learning-induced metaplasticity in the hippocampus. *Cereb Cortex* 16, 460-468.

## **12. ANEXO 3**

El anexo 3 es una revisión del tema "Plasticidad homeostática y memoria", misma que será enviada próximamente para su publicación.

# Plasticidad Homeostática y memoria

Rodríguez-Durán L. F.<sup>1</sup> and Escobar M. L.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>División de Investigación y Estudios de Posgrado, Facultad de Psicología, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México

## Resumen

Hoy en día se sabe que la historia de activación de las neuronas modula las respuestas futuras a determinados estímulos. La actividad neuronal puede ocasionar cambios plásticos en las neuronas y estos cambios incluyen cambios en la eficiencia sináptica como la LTP o LTD. Además, se ha observado que la actividad modifica el umbral para la inducción de subsecuente plasticidad sináptica y éste fenómeno es conocido como metaplasticidad. Los cambios metaplásticos protegen a las neuronas modificando el umbral para la inducción de LTP, evitando un exceso de actividad. Sin embargo, la relevancia de dicho fenómeno para las funciones neuronales parece ser mayor. Se ha observado que durante tareas de aprendizaje o debido a la estimulación sensorial se presenta metaplasticidad, lo cual sugiere que su papel no es solo protector, sino modulador de la información. Pero, ¿cómo participa la metaplasticidad en los fenómenos de aprendizaje y memoria?, ¿Que otras formas de plasticidad homeostática participan en el aprendizaje y la memoria?, ¿cómo se conjuntan diferentes formas de plasticidad para determinar un patrón mnémico? El principal objetivo de la presente revisión es mostrar los avances recientes en el estudio de la plasticidad homeostática con relación al aprendizaje y la memoria.

## INTRODUCCIÓN

Una de las habilidades más relevantes para la supervivencia de los seres vivos es su capacidad para adaptarse al medio de diferentes maneras. Entre ellas, las células del sistema nervioso (SN) cuentan con la capacidad de modificar morfológica y funcionalmente la eficiencia de la transmisión sináptica en respuesta a la actividad. Ésta propiedad de las neuronas es conocida con el nombre de plasticidad sináptica y es considerada como la base de fenómenos adaptativos como el aprendizaje y la memoria. Además de su papel en dichos fenómenos, actualmente se sabe que la plasticidad sináptica es crucial para el desarrollo del sistema nervioso y se encuentra involucrado en algunos trastornos neuropsiquiátricos (Bear et al., 2001; Citri and Malenka, 2008; Milner et al., 1998).

Las células en el SN reciben constantemente estímulos de otras neuronas y poseen diversos mecanismos plásticos que modulan sus respuestas a dicha estimulación. Actualmente se han distinguido dos formas diferentes de plasticidad sináptica (Turrigiano, 1999). En primer lugar, están las modificaciones plásticas de tipo "hebbiano", las cuales tienden a desestabilizar las propiedades neuronales, produciendo cambios persistentes en la comunicación neuronal. Por ejemplo, los cambios en la eficiencia sináptica tales como la LTP y la LTD son considerados plasticidad hebbiana, ya que la actividad puede desestabiliza las propiedades sinápticas dando lugar a un aumento (LTP) o decremento (LTD) persistente en la eficiencia sináptica. En segundo lugar existen las modificaciones plásticas "no hebbianas" que son también llamadas "plasticidad homeostática". Las neuronas inician una serie de mecanismos homeostáticos con el fin de mantener los niveles de eficiencia

sináptica en un rango determinado, resistiéndose de este modo a las modificaciones abruptas. Sin plasticidad homeostática, fenómenos como la LTP o la LTD provocarían niveles de actividad extremos que pueden producir el deceso de las células neuronales (ya sea por exceso o por falta de actividad). De manera similar, sin mecanismos homeostáticos operando a nivel de los contactos sinápticos, sería imposible conservar el patrón de actividad eléctrica característico de cada vía. (Pérez-Otaño and Ehlers, 2005; Turrigiano and Nelson, 2004). El SN cuenta con mecanismos específicos para mantener el equilibrio de dichas funciones neuronales. Puede decrementar o incrementar progresivamente la fuerza de las entradas sinápticas en una vía, conservando la eficiencia sináptica total en un rango específico (escalamiento sináptico) o modificar la posibilidad de inducir subsecuente plasticidad sináptica (metaplasticidad) (Abraham, 2008; Citri and Malenka, 2008; Pérez-Otaño and Ehlers, 2005).

Hoy en día se sabe que la historia de activación de las neuronas modula las respuestas futuras a determinados estímulos. Por ejemplo, se ha observado que la actividad modifica el umbral para la inducción de subsecuente plasticidad sináptica y se ha propuesto que estos cambios metaplásticos pueden, por ejemplo, proteger a las neuronas del exceso de actividad modificando el umbral para la inducción de LTP (Bear, 2003). Sin embargo, la relevancia de dicho fenómeno para las funciones neuronales parece ser mayor. Se ha observado que durante tareas de aprendizaje o debido a la estimulación sensorial se presenta metaplasticidad, lo cual sugiere que su papel no es solo protector, sino modulador de la información. En esta revisión se abordará el tema de las diferentes expresiones de plasticidad homeostática y como se relacionan con la memoria de ciertas tareas conductuales.

## **METAPLASTICIDAD**

La magnitud en la LTP inducida electrofisiológicamente se encuentra en función de la frecuencia de estimulación. En las colaterales de Shaffer, por ejemplo, se ha reportado que se puede inducir LTP con estimulación de 50 Hz, 100 Hz, 200Hz y con estimulación theta. Análogamente, es posible inducir LTD en la misma vía con 1 Hz o con 5 Hz de estimulación y para cada protocolo de estimulación se presenta un cambio en la eficiencia sináptica de diferente magnitud (Artola et al., 2006; Zakharenko et al., 2003). Asimismo, existen frecuencias de estimulación con las cuales no se presentan ni la LTP ni la LTD, por ejemplo en el área CA1 del hipocampo se ha observado que estimulación sináptica de baja frecuencia (30 Hz) produce una potenciación a corto plazo, es decir, que el aumento en la eficiencia sináptica tiene una duración de más de 30 minutos, pero menos de una hora. Después de éste tiempo la eficiencia sináptica vuelve a la línea basal y aparentemente no se produce ningún cambio en la vía (Malenka, 1991). Sin embargo el cambio se observa cuando se induce LTP en la misma vía que fue previamente estimulada, estos cambios incluyen una inhibición de la LTP y una facilitación de la LTD (Abraham and Bear, 1996; Huang et al., 1992) A dicho fenómeno se le conoce como metaplasticidad, el cual es definido como “un cambio en la posibilidad de inducir plasticidad sináptica subsecuente” y es atribuido a una modificación en el umbral para inducir cambios plásticos dependiente de la actividad (Abraham and Bear, 1996) (figura 1) La metaplasticidad es un fenómeno donde la actividad es

capaz de modificar el umbral para la inducción de plasticidad sináptica, resistiéndose de este modo a un cambio en la eficiencia sináptica y conservando su nivel de excitabilidad (Abraham and Bear, 1996; Bear, 1996). El cómo y bajo qué condiciones se modulan dichos umbrales es una interesante cuestión que se ha abordado tanto desde el punto de vista de los modelos matemáticos como experimentalmente.

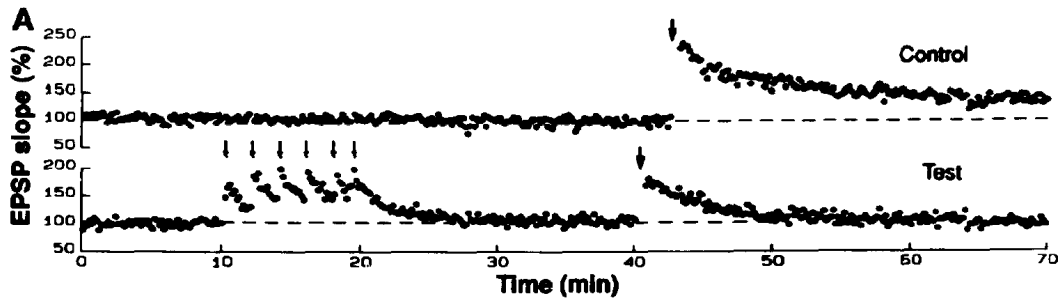
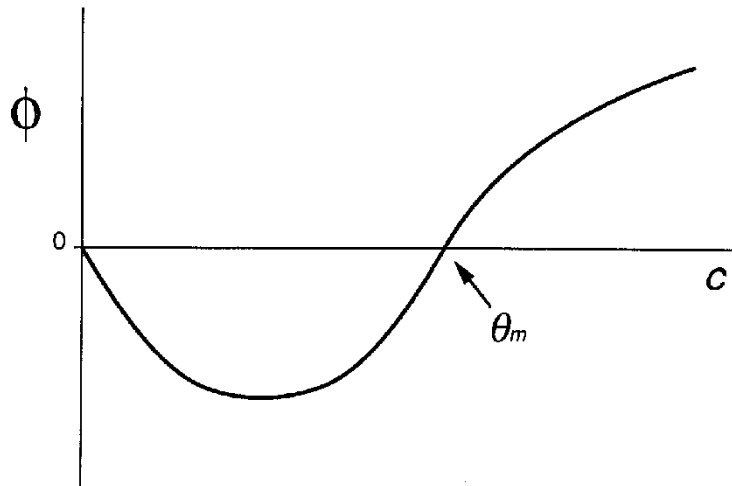


Figura 1. Efectos de la estimulación previa sobre la inducción de LTP en el área CA1 hipocampal. A, en una situación experimental donde normalmente se puede inducir el fenómeno de la LTP, la potenciación se ve inhibida debido a la previa estimulación de baja frecuencia (tomado de Huang et al., 2002).

### Modelo BCM

En 1982, Bienestock, Cooper y Munro propusieron la existencia de un umbral de activación postsináptica, es decir, que una vía es potenciada cuando la activación postsináptica excede un valor crítico llamado umbral de modificación o  $\theta_m$  mientras que una vía es depotenciada cuando la activación postsináptica es mayor que cero pero menor que el valor  $\theta_m$  (figura 2), a este modelo se le conoce como BCM (Bienestock, Cooper y Munro). Es importante mencionar que dicho umbral no es fijo (Bienestock et al., 1982; Cooper et al., 1979). La frecuencia de estimulación es directamente proporcional a la activación de la postsinápsis, esto es, que a frecuencias más altas hay mayor activación de la postsinápsis mientras que a frecuencias más bajas la activación es menor (Bear, 1996). La relación ya mencionada entre la frecuencia de estimulación con la magnitud y dirección en los cambios en la eficiencia sináptica es explicada mediante el hecho de que la cantidad de calcio que ingresa a la célula neuronal es dependiente de la frecuencia mediante la cual sea estimulada la neurona (Bear, 2003; Jedlicka, 2002), de hecho, se ha reportado que cuando se aplica estimulación que induce LTP, pero es inhibida parcialmente la entrada de calcio a la célula, se presenta LTD en lugar de LTP (Taniike et al., 2008). Entonces, bajas frecuencias están asociadas a bajas cantidades de calcio (menor a  $0.5 \mu\text{M}$ ) y por lo tanto a la inducción de LTD, mientras que las altas frecuencias están asociadas a un mayor ingreso de calcio (mayor a  $0.5 \mu\text{M}$ ) y por lo tanto a la inducción de LTP (Cormier and Kelly, 1996; Jedlicka, 2002). Además, el tiempo que permanezca el calcio en el interior de la célula también juega un papel importante (Jedlicka, 2002). Por ejemplo, para la inducción de LTD se necesita de la introducción de bajas cantidades de calcio pero en tiempos mayores que para la inducción de la LTP (Taniike et al., 2008).





**Figura 2. Modelo BCM.** Función que explica la relación entre el nivel de potenciación ( $\Phi$ ) y el nivel de activación postsináptica ( $c$ ). La gráfica muestra como al ir aumentando, a partir de cero, el nivel de activación de la post-sinapsis o la frecuencia de estimulación (eje de las  $x$ ), primero se observan decrementos en la eficiencia sináptica (es decir LTD) (eje de las  $y$ ) y a medida que va incrementando el grado de activación o frecuencia nos encontramos con el umbral  $\theta_m$ , tras cruzar este umbral se observa un incremento en la eficiencia sináptica (es decir LTP; tomado de Bear, 1996).

### Mecanismos moleculares de la metaplasticidad

En la actualidad, se conocen parte de los mecanismos moleculares mediante los cuales la actividad previa modula el umbral para inducir plasticidad sináptica subsecuente. Se sabe que para modificar dicho umbral es necesario modular la entrada de calcio al interior de la célula en respuesta de la actividad, para lo cual la célula cuenta con una serie de mecanismos moleculares que serán mencionados a continuación (Nishiyama et al., 2000). La modulación de la actividad de proteínas cinasas y fosfatasas puede modificar el umbral para la inducción de plasticidad sináptica. Por ejemplo, el aumento en los niveles de calcio en el citoplasma de la célula neuronal promueve la autofosforilación de la CaMKII. Al estar autofosforilada, la actividad de la CaMKII es independiente del calcio, lo cual impide que ésta proteína responda a la actividad sináptica subsecuente. (Bear, 2003; Jedlicka, 2002; Zhang et al., 2005).

Se ha propuesto un mecanismo mediante el cual los cambios en el umbral  $\theta_m$  son dependientes de la proporción de las subunidades del receptor tipo N-metil-D-aspartato (NMDA; Philpot et al., 2007; Quinlan et al., 2004; Quinlan et al., 1999). La subunidad NR2A tiene una cinética más rápida, es decir, los canales NMDA que contienen la subunidad NR2A abren y cierran un mayor número de veces que cuando dichos canales contienen la subunidad NR2B (Erreger et al., 2005).

Éste efecto produce que los receptores NMDA que contengan subunidades NR2A, presenten una mayor resolución (es decir, responde más efectivamente) ante los estímulos de alta frecuencia, como los que inducen LTP, mientras que los que contengan la subunidad NR2B tendrán una mayor resolución ante estímulos de baja frecuencia, como los que inducen LTD (Pérez-Otaño and Ehlers, 2005; Quinlan et al., 2004). La actividad produce un aumento en los receptores NMDA que contienen la subunidad NR2A en el

espacio sináptico, haciendo que se requieran frecuencias más altas para introducir la misma cantidad de calcio, modificando el umbral  $\theta_m$  (Pérez-Otaño and Ehlers, 2005). Esto provoca que con una determinada frecuencia de estimulación se induzca una LTP de menor magnitud. De la misma forma, la LTD es más fácil de inducir, ya que con frecuencias con las que normalmente se induce LTP, se induce LTD o no se presenta ningún cambio en la eficiencia sináptica (Pérez-Otaño and Ehlers, 2005; Philpot et al., 2007; Philpot et al., 2001).

### **Metaplasticidad durante el aprendizaje y la memoria**

Los cambios metaplásticos se encuentran representados en diversas áreas del sistema nervioso central como la neocorteza o el hipocampo, áreas que se consideran como el almacén de diversos tipos de memoria (Bear, 1996). El entrenamiento en determinadas tareas conductuales produce cambios en la posibilidad de inducir subsecuente plasticidad, como lo muestran Rioult-Pedotti y su grupo en el 2000. Ellos entrenaron a un grupo de ratas en el aprendizaje de una tarea motora (motor skill learning) (Rioult-Pedotti et al., 2000). Posterior al entrenamiento, se indujo potenciación a largo plazo en el hemisferio entrenado y se observó que dicha tarea reduce la magnitud de la LTP y aumenta la magnitud de la LTD, comparada con el hemisferio contralateral el cual se utilizó como control, mostrando que la conducta produce cambios en las propiedades neuronales que van a modificar el umbral para la inducción de plasticidad sináptica subsecuente (Rioult-Pedotti et al., 2000). Los cambios metaplásticos inducidos por la conducta también se han encontrado en la corteza piriforme debido a tareas de discriminación olfativa (Quinlan et al., 2004) en la corteza visual en respuesta a la estimulación visual (Philpot et al., 2007), en la amígdala lateral debido al condicionamiento al miedo (Hong et al., 2011; Schroeder and Shinnick-Gallagher, 2005), en la corteza somatosensorial debido a la estimulación de las vibras (Clem et al., 2008), en la corteza insular debido al condicionamiento aversivo a los sabores (Rodríguez-Duran et al., 2011) e incluso se han reportado cambios metaplásticos in vivo en la corteza motora en respuesta al entrenamiento en habilidades motoras (Monfils and Teskey, 2004). El aprendizaje de ciertas tareas conductuales además de estar acompañado de incrementos en la eficiencia sináptica, se presenta conjuntamente con cambios en las propiedades biofísicas como la relación entrada-salida de los potenciales postsinápticos excitatorios (EPSPs), los cuales a su vez se encuentran relacionados con cambios en la posibilidad de inducir subsecuente plasticidad sináptica o metaplasticidad (Hong et al., 2011; Rioult-Pedotti et al., 2007; Rodríguez-Duran et al., 2011; Schroeder and Shinnick-Gallagher, 2005). De igual forma se han encontrado que tanto el estrés como los ambientes enriquecidos son capaces de modular el umbral  $\theta_m$  (Artola et al., 2006; Richter-Levin and Maroun, 2010).

### **Mecanismos moleculares de la metaplasticidad inducida por tareas de aprendizaje**

Se han descrito parte de los mecanismos involucrados en la metaplasticidad inducida por el entrenamiento en tareas de aprendizaje (Abraham, 2008; Quinlan et al., 2004; Schroeder and Shinnick-Gallagher, 2004). En la corteza piriforme se observó que el aprendizaje olfativo modula la

proporción de las subunidades del receptor NMDA, incrementando la subunidad NR2A sobre la NR2B en los animales entrenados en la tarea de discriminación olfativa fue inhibida la LTP en la corteza piriforme, lo cual refleja un cambio en el umbral  $\theta_m$  (Quinlan et al., 2004). Por otro lado, el entrenamiento en el condicionamiento al miedo disminuye la magnitud de la LTP en las fibras cortico-amígdala lateral. De manera interesante, la LTP en los animales entrenados se vuelve independiente de los receptores NMDA y de los canales de calcio dependientes de voltaje, lo cual sugiere que un cambio en el requerimiento de determinados canales para la inducción de plasticidad sináptica también es un mecanismo para modificar el umbral para la inducción subsecuente de plasticidad sináptica (Schroeder and Shinnick-Gallagher, 2004).

Asimismo, se ha encontrado que numerosas moléculas que se encuentran relacionadas con la formación y persistencia de la memoria tienen injerencia en los fenómenos metaplásticos (Castillo et al., 2006; Chen et al., 2010; Ferguson et al., 2008; Madronal et al., 2010; Sajikumar et al., 2009; Schjetnan and Escobar, 2012; Young et al., 2006). Por ejemplo la activación del adenosin monofosfato cíclico (AMPC) así como de las proteínas cinasas calcio calmodulina cinasa tipo II (CamKII), proteína cinasa C (PKC) y proteína cinasa A (PKA), son necesarias para la metaplasticidad en diversas áreas del SN (Ferguson et al., 2008; Jung et al., 2008; Sajikumar et al., 2009; Young et al., 2006). Incluso se ha visto que la inhibición de genes de expresión temprana como ERK puede evitar que se produzca metaplasticidad (Chen et al., 2010). Recientemente se ha descrito que una isoforma de las PKCs, que es conocida como proteína cinasa  $M\zeta$  (PKM $\zeta$ ), es necesaria para el mantenimiento de largo plazo tanto para la LTP como para diferentes tareas conductuales (Sacktor, 2008) y se ha reportado que la infusión intracortical de ZIP, un inhibidor de la PKM $\zeta$  puede revertir la metaplasticidad (Madronal et al., 2010; Sajikumar et al., 2009).

La neurotrofina denominada factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) es considerada actualmente como un importante mediador de la plasticidad sináptica (Gomez-Palacio Schjetnan and Escobar-Rodriguez, 2007). Se ha reportado que la infusión de BDNF induce incrementos en la eficiencia sináptica en la vía visual (Jiang et al., 2001) y nuestro grupo de investigación encontró que el BDNF induce incrementos en la eficiencia sináptica en la CI (Escobar et al., 2003). Como se mencionó en líneas anteriores, el incremento en la eficiencia sináptica se encuentra relacionado con un cambio en la posibilidad de inducir plasticidad sináptica subsecuente y recientes investigaciones de nuestro grupo de investigación revelan que la infusión intracortical de BDNF puede modificar la subsecuente inducción de LTP en las fibras musgosas del hipocampo (Schjetnan and Escobar, 2012) Incluso el BDNF puede modificar la retención del condicionamiento aversivo a los sabores (Castillo et al., 2006; Gomez-Palacio Schjetnan and Escobar-Rodriguez, 2007), mostrando que los cambios metaplásticos inducidos por el BDNF afectan al aprendizaje de tareas conductuales.

## **La metaplasticidad como parte del trazo de memoria**

Hasta el momento no se conoce con certeza cómo participa la metaplasticidad en los fenómenos de aprendizaje y memoria (Abraham, 2008). Se sabe que la historia de la activación de las neuronas modula las respuestas futuras a determinados estímulos, para adaptarse a los requerimientos del sistema y se considera que una modificación en el umbral para la inducción de subsecuente plasticidad sináptica puede proteger a la célula, por ejemplo, de estímulos que le puedan provocar excitotoxicidad (Bear, 2003). Sin embargo la relevancia de dicho fenómeno parece ser mayor. El hecho de que se presenten cambios metaplásticos durante el entrenamiento en tareas de aprendizaje sugiere que su papel no es solo protector, sino modulador de la información. A este respecto, si la metaplasticidad forma parte del trazo de memoria, los fenómenos metaplásticos que acompañan a las tareas de aprendizaje deben ser revertidos cuando se extingue o bloquea un aprendizaje adquirido. Recientemente en nuestro laboratorio, observamos que el entrenamiento en el condicionamiento aversivo a los sabores (CAS) modifica persistentemente la habilidad de inducir LTP en la CI (figura 3). Además, nuestros resultados mostraron que la inhibición de la síntesis de proteínas evita la formación del CAS, y también revierte el efecto del CAS sobre la inducción de LTP en la CI, sugiriendo que el efecto metaplástico y la memoria del CAS son inducidos y consolidados conjuntamente (Rodríguez-Duran et al., 2011).

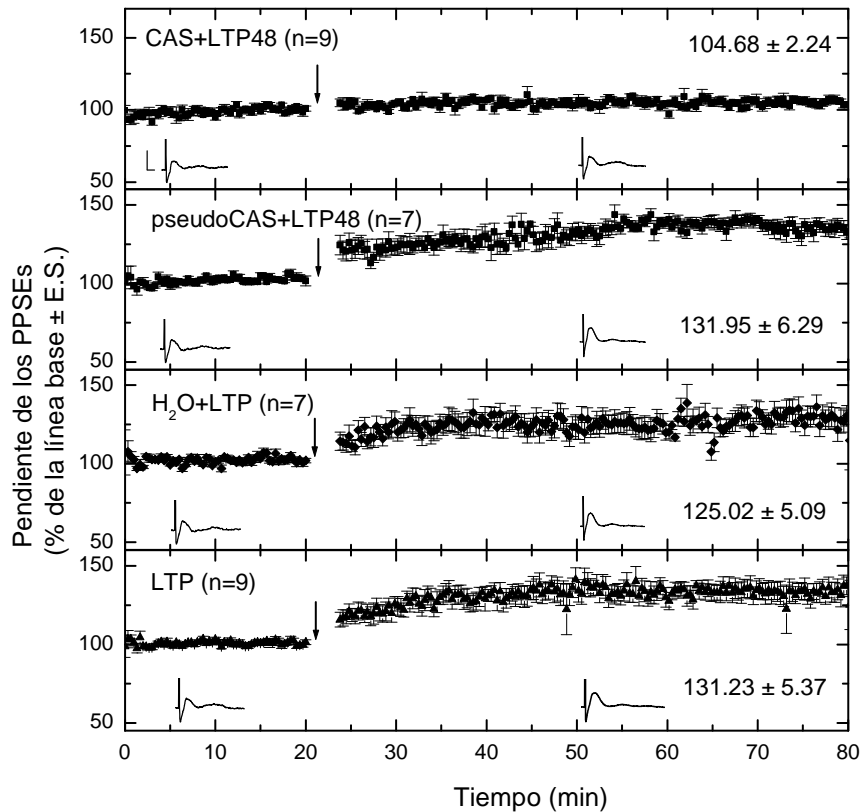
De manera análoga, un reciente estudio reportó que el condicionamiento al miedo bloquea la inducción de la LTP en la vía tálamo-amígdala lateral. Es interesante mencionar que la extinción del condicionamiento al miedo también revierte el efecto del entrenamiento en el condicionamiento al miedo sobre la inducción de LTP en la amígdala lateral (Hong et al., 2011). Ésos estudios sugieren que los fenómenos metaplásticos forman parte en sí del trazo de memoria.

Por otro lado, se ha propuesto que los cambios metaplásticos inducidos por el aprendizaje podrían estar afectando la adquisición de un nuevo aprendizaje. Se ha reportado que el aprendizaje de una tarea conductual relacionada con el parpadeo (eye-blink conditioning) induce un decremento a largo plazo de las corrientes hiperpolarizantes que suceden al potencial de acción (AHP), lo cual afecta directamente a la formación de un nuevo aprendizaje (Abraham, 2008; Disterhoft et al., 1988). El decremento en las corrientes AHP se ha observado en las células piramidales del área CA1 hipocampal debido al entrenamiento en el laberinto de agua de Morris y en la corteza piriforme tras el entrenamiento en una tarea de discriminación olfativa. Asimismo se ha propuesto que los cambios metaplásticos descritos en líneas anteriores pueden facilitar la adquisición de un nuevo aprendizaje (Abraham, 2008; Brosh et al., 2007; Cohen-Matsliah et al., 2007; Saar et al., 1998; Zelcer et al., 2006).

## **MODULACIÓN HOMEOSTÁTICA DE LA ACTIVIDAD INTRÍNSECA**

Las células nerviosas se encuentran en modificación constante. Por ejemplo, se presentan retraimiento y estiramiento de las dendritas, así como

cambios significativos en el número y tamaño de las sinapsis en cuestión de

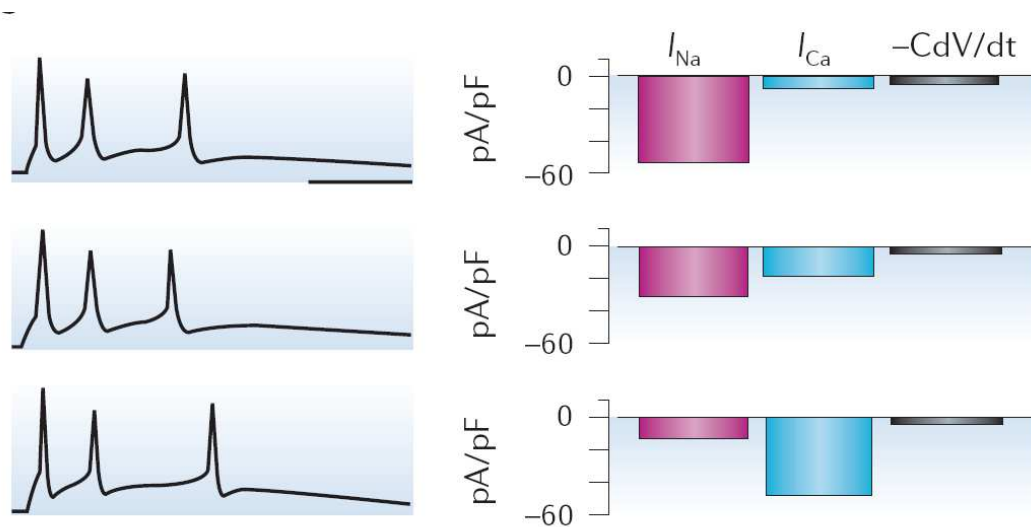


**Figura 3. El entrenamiento en el CAS modifica la posibilidad de inducir LTP en la CI.** El previo entrenamiento en el CAS inhibe la inducción de LTP en la CI 48 horas posteriores al entrenamiento (grupo CAS+LTP48). Dicha modificación no se observó cuando se presentaron sólo el estímulo gustativo (sacarina; grupo pseudoCAS+LTP48) o el estímulo aversivo (cloruro de litio; grupo H<sub>2</sub>O+LTP) ni cuando no se entrenó a los animales previamente en el CAS (grupo LTP). las gráficas representan la media ( $\pm$  E.S.) del porcentaje de la pendiente de los potenciales postsinápticos excitatorios (PPSEs) con respecto a la línea base (100%) para cada grupo. La flecha representa la estimulación de alta frecuencia (10 trenes de 100 Hz/1s/20s intertrén). Los trazos muestran ejemplos representativos de los PPSEs tomados 10 minutos antes y 60 minutos después de la estimulación de alta frecuencia. Los números al interior de cada gráfica representan la media ( $\pm$  E.S.) de la pendiente de los PPSEs después de la estimulación de alta frecuencia para cada grupo. Escala: 0.4 mV, 9 ms (tomado de Rodríguez-Durán et al., 2011).

minutos (Engert and Bonhoeffer, 1999; Fonseca et al., 2006; Toni et al., 1999). Asimismo, proteínas como las que se encuentran involucradas en la plasticidad sináptica, tienen una vida media de días, horas y hasta minutos, son constantemente recicladas por medio de mecanismos de degradación y remplazadas por nuevas (Fonseca et al., 2006; Hubener and Bonhoeffer, 2010; Nagerl et al., 2007). Si las neuronas se encuentran bajo cambios estructurales constantes y además renuevan continuamente sus proteínas, ¿cómo conservan sus propiedades electrofisiológicas, manteniendo en un rango determinado la intensidad de sus disparos, durante horas, días, meses y hasta años? En este apartado se tocará el tema de la regulación homeostática que presentan las neuronas a través de la modulación de las conductancias de sus canales.

Las neuronas pueden preservar las características de las respuestas postsinápticas, aun cuando existen modificaciones en los canales iónicos participes de dichas respuestas (Marder and Goaillard, 2006). La excitabilidad intrínseca se refiere a la propensión de una neurona a responder a un estímulo determinado y es atribuida al tipo y cantidad de canales que se encuentran insertados en la membrana de dichas células. La modificación de la excitabilidad intrínseca cambia la capacidad de responder de las neuronas y actualmente se han encontrado mecanismos homeostáticos que la conservan en determinado nivel con el fin de mantener una red neuronal estable (Schulz, 2006). El sistema puede, por ejemplo, modular sus propiedades intrínsecas a través de la compensación de las conductancias de los canales involucrados en determinada red de neuronas (Marder and Goaillard, 2006).

En el disparo de una neurona participan las conductancias de diferentes canales iónicos y cada conductancia de un tipo de canal aporta un elemento particular al trazo total del potencial de acción. Sin embargo, se ha encontrado que células neuronales del mismo tipo presentan trazos de corriente muy similares, a pesar de que la colaboración de los diferentes tipos de canales varía una respecto de la otra. Por ejemplo, en las neuronas pilóricas laterales del ganglio estomatogástrico del cangrejo se encontró que 2 neuronas de diferentes sujetos presentan variaciones en las proporciones de tres diferentes corrientes de potasio, a pesar de que los patrones de disparo son casi idénticos (Schulz, 2006) Se ha observado en células de purkinje que a pesar de presentar respuestas eléctricas con características muy similares, las células presentan diferentes proporciones de la contribución de las corrientes de  $K^+$ ,  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$ , lo cual muestra que existe una compensación de las conductancias, aun cuando sean diferentes canales y permeables a diferentes iones (figura 4; Swensen and Bean, 2005).



**Figura 4. Diferentes proporciones en la participación de dos tipos de canales iónicos en los disparos de las fibras de purkinje.** Los trazos muestran diferentes respuestas de las células de Purkinje a la estimulación. La gráfica muestra las diferentes participaciones de las corrientes de sodio ( $I_{Na}$ ) y calcio ( $I_{Ca}$ ), mientras que la corriente iónica neta ( $-CdV/dt$ ) se mantiene igual (Tomado de Marder y Goaillard, 2006).

Se ha sugerido que las neuronas necesitan tener un “nivel de actividad ideal”, es decir, las conductancias de los canales que participan en el trazo de la respuesta neuronal deben de ajustarse hasta llegar un nivel determinado de actividad total. Asimismo, se ha propuesto que para mantener las respuestas en el nivel deseado, la neurona censa los cambios en la actividad de segundos mensajeros como el  $\text{Ca}^{2+}$  o el (AMPC) que son dependientes de la actividad (Yu and Goda, 2009). Recientemente se ha observado que la entrada de calcio puede modular homeostáticamente las propiedades intrínsecas de los disparos de las neuronas, a través de la modulación de los canales de  $\text{K}^+$  (Toescu and Vreugdenhil, 2010) la cual es dependiente de el ingreso de calcio a la célula por medio de canales de calcio dependientes de (D'Angelo, 2010; O'Leary et al., 2010). Sin embargo, el papel de estos segundos mensajeros en la modulación de las conductancias aún está por esclarecerse.

### **Plasticidad intrínseca durante el aprendizaje y la memoria**

Se ha propuesto que los cambios homeostáticos en la excitabilidad intrínseca forman parte de los cambios plásticos inducidos durante el aprendizaje y la memoria (Brager and Johnston, 2007; Turrigiano, 2011), ya que algunos de estos cambios dependen de la activación de mecanismos relacionados con el aprendizaje y memoria como la entrada de calcio, la activación de receptores glutamatérgicos metabotrópicos o la activación de proteína como la cinasa C (PKC) (Brager and Johnston, 2007; Toescu and Vreugdenhil, 2010). Además, se ha reportado que animales entrenados en diversas tareas de aprendizaje como el condicionamiento clásico o el condicionamiento al parpadeo presentan incrementos en la excitabilidad intrínseca del soma y las dendritas (Coulter et al., 1989; Daoudal and Debanne, 2003). Actualmente es considerado que los cambios homeostáticos en las propiedades intrínsecas son frecuentemente acompañados de cambios plásticos de tipo hebbiano (Nelson and Turrigiano, 2008) o de cambios homeostáticos como el escalamiento sináptico o la metaplasticidad (Echegoyen et al., 2007; Nelson and Turrigiano, 2008).

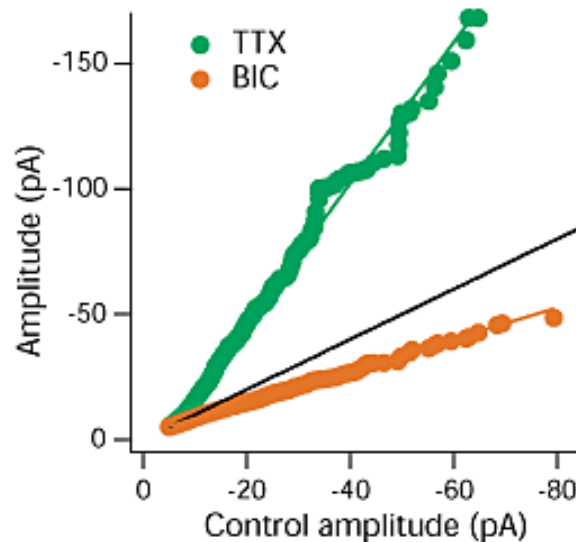
### **ESCALAMIENTO SINÁPTICO**

El exceso de actividad en una neurona puede ocasionar que la célula presente actividad epiléptica o incluso muerte celular por exitotoxicidad, mientras que la falta de actividad promueve la muerte neuronal por medio de procesos de degradación (Hardingham and Bading, 2003). Las células neuronales requieren de un equilibrio en su nivel de activación y existe una serie de mecanismos homeostáticos que ayudan a mantenerlo. Dichos mecanismos son englobados en un fenómeno que es conocido como escalamiento sináptico, el cual mantiene en un nivel relativamente estable la excitabilidad neuronal mediante un incremento progresivo de la eficiencia sináptica en respuesta a la inhibición prolongada de la actividad, y un decremento progresivo de la eficiencia sináptica en respuesta a la actividad crónica (Pozo and Goda, 2010; Turrigiano, 2008; Yu and Goda, 2009).

En 1998 Turrigiano y su grupo reportaron que el bloqueo crónico de receptores al GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico) durante 48 horas, produce un decremento progresivo de las corrientes postsinápticas excitatorias en

miniatura (CPSEm, figura 5), compensando el aumento en la actividad en ausencia de dichos receptores. Cuando se presenta inhibición crónica de los canales de sodio se produce un incremento en las CPSEm, compensando la disminución en la actividad (figura 5; Turrigiano et al., 1998; Turrigiano and Nelson, 2004). Este fenómeno se ha observado en cultivos de células neocorticales, hipocampales, de la médula espinal, en el núcleo accumbens, en diversos relevos de vías sensoriales como la visual o la auditiva e incluso en animales *in vivo* (Abbott and Nelson, 2000; Gao et al., 2010; Knogler et al., 2010; Whiting et al., 2009), mostrando que las células del SN tienen la capacidad de integrar los estímulos recibidos para ajustar la eficiencia sináptica a través de la modulación progresiva de sus respuestas sinápticas (Turrigiano, 2011; Turrigiano, 2008).

Los receptores inotrópicos glutamatérgicos de tipo AMPA (ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazolepropiónico) y NMDA juegan un papel importante en el escalamiento sináptico (Gainey et al., 2009; Gao et al., 2010; Shepherd et al., 2006). La modulación de la expresión e inserción en el espacio sináptico de dichos receptores constituye un mecanismo para la regulación de la corriente durante el escalamiento sináptico, ya que se han reportado incrementos en la cantidad de receptores AMPA y NMDA adosados a la membrana sináptica en respuesta a la baja actividad y decrementos en respuesta a la alta actividad (Earnshaw and Bressloff, 2008; Gainey et al., 2009; Pérez-Otaño and Ehlers, 2005; Watt et al., 2000).



**Figura 5. Escalamiento sináptico.** La inhibición por 48 horas de los canales de sodio con TTX promueve un decremento progresivo de la amplitud de las CPSEm, mientras que, el bloqueo de los canales inhibitorios GABA provoca un incremento progresivo de las CPSEs. (Tomado de Abbot y Nelson, 2000).

### Escalamiento sináptico durante el aprendizaje y la memoria

Aún cuando existen modelos computacionales del aprendizaje y la memoria donde se incluye al escalamiento sináptico (Sullivan and de Sa, 2008; Yeung et al., 2004), no se conoce con certeza el papel que juega dicho fenómeno en el aprendizaje y la memoria. Recientemente se ha reportado que ciertas moléculas que se encuentran relacionadas con diversas expresiones de



plasticidad sináptica se encuentran involucradas en el escalamiento sináptico. Por ejemplo, el BDNF promueve el escalamiento sináptico en células neocorticales (Copi et al., 2005; Liu et al., 2007). También se ha observado que la inactivación genética de la proteína adenilato ciclasa revierte los efectos del escalamiento sináptico, evocado por el bloqueo de los receptores AMPA en células neocorticales (Gong et al., 2007). Además, se ha observado que proteínas que son activadas en el proceso de transcripción como el factor de transcripción CREB y el gen de expresión temprana Arc/Arg3.1, son cruciales para la expresión de el escalamiento sináptico (Gong et al., 2007; Shepherd et al., 2006).

A través del escalamiento sináptico se modula de manera progresiva la eficiencia sináptica de las neuronas y actualmente se considera que éste fenómeno conserva las propiedades de los disparos de las neuronas *in vivo* cuando éstas se encuentran bajo modificaciones plásticas (Turrigiano, 2008; Turrigiano and Nelson, 2004). El escalamiento sináptico podría ser iniciado junto con los cambios morfológicos y en la eficiencia sináptica promovidos por el aprendizaje, formando así, parte del repertorio de modificaciones mediante las cuales el organismo es capaz de almacenar información.

## **CONCLUSIONES**

La plasticidad homeostática es actualmente considerada como una función que tiene especial importancia para la modulación de la actividad en el SN. Los cambios homeostáticos son considerados parte del repertorio de mecanismos plásticos que actúan en el SN en animales a diferentes niveles filogenéticos, modulando las respuestas ante los estímulos externos.

Como ya vimos, la plasticidad homeostática se encuentra relacionada con el desarrollo del sistema nervioso, con la estimulación sensorial así como con el almacenamiento de la información. Actualmente se considera que los diferentes mecanismos de plasticidad homeostática interactúan con los mecanismos hebbianos para modular las respuestas neuronales (Abraham, 2008; Pérez-Otaño and Ehlers, 2005). Por ejemplo, en respuesta la privación visual, se ha observado que en la corteza visual relacionada con el ojo privado se presenta un decremento en la eficiencia sináptica (LTD) homosináptico dependiente del receptor NMDA y de los receptores a endocannabinoides (Smith et al., 2009), escalamiento sináptico en respuesta a la falta de estimulación (Gainey et al., 2009) así como una disminución en el umbral para inducir subsecuente plasticidad sináptica (Philpot et al., 2007). Aunado a esto, la privación visual promueve un incremento en la eficiencia sináptica (LTP) homosináptica en la corteza visual relacionada con el ojo no privado (Smith et al., 2009). Estas diferentes expresiones de plasticidad sináptica iniciados por el mismo evento muestran cómo diferentes fenómenos plásticos llegan a conjuntarse en condiciones naturales, sugiriendo además que los cambios homeostáticos se presentan constantemente en el sistema nervioso y son parte integral de las modificaciones dependientes de la actividad que modulan el comportamiento de los animales.

Y, si bien los cambios homeostáticos han estado más relacionados con la adaptación y protección de las células neuronales, no se debe dejar de lado

las evidencias que muestran que estos mecanismos tienen la misma injerencia que la plasticidad hebbiana en fenómenos como el aprendizaje y la memoria. Juntos, las diferentes formas de plasticidad forman una orquesta de mecanismos en un equilibrio que sostienen las funciones del SN durante toda la vida de un individuo.

#### Referencias

- Abbott, L.F., and Nelson, S.B. (2000). Synaptic plasticity: taming the beast. *Nature neuroscience* 3 *Suppl*, 1178-1183.
- Abraham, W.C. (2008). Metaplasticity: tuning synapses and networks for plasticity. *Nature reviews*.
- Abraham, W.C., and Bear, M.F. (1996). Metaplasticity: the plasticity of synaptic plasticity. *Trends in neurosciences* 19, 126-130.
- Artola, A., von Frijtag, J.C., Fermont, P.C., Gispen, W.H., Schrama, L.H., Kamal, A., and Spruijt, B.M. (2006). Long-lasting modulation of the induction of LTD and LTP in rat hippocampal CA1 by behavioural stress and environmental enrichment. *The European journal of neuroscience* 23, 261-272.
- Bear, M.F. (1996). A synaptic basis for memory storage in the cerebral cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 13453-13459.
- Bear, M.F. (2003). Bidirectional synaptic plasticity: from theory to reality. *Philosophical transactions of the Royal Society of London* 358, 649-655.
- Bear, M.F., Connors, B.W., and Paradiso, M.A. (2001). *Neuroscience : exploring the brain*, 2nd edn (Baltimore, Md., Lippincott Williams & Wilkins).
- Bienenstock, E.L., Cooper, L.N., and Munro, P.W. (1982). Theory for the development of neuron selectivity: orientation specificity and binocular interaction in visual cortex. *J Neurosci* 2, 32-48.
- Brager, D.H., and Johnston, D. (2007). Plasticity of intrinsic excitability during long-term depression is mediated through mGluR-dependent changes in I(h) in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 27, 13926-13937.
- Brosh, I., Rosenblum, K., and Barkai, E. (2007). Learning-induced modulation of SK channels-mediated effect on synaptic transmission. *The European journal of neuroscience* 26, 3253-3260.
- Castillo, D.V., Figueroa-Guzman, Y., and Escobar, M.L. (2006). Brain-derived neurotrophic factor enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Res* 1067, 250-255.
- Citri, A., and Malenka, R.C. (2008). Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33, 18-41.
- Clem, R.L., Celikel, T., and Barth, A.L. (2008). Ongoing in vivo experience triggers synaptic metaplasticity in the neocortex. *Science (New York, NY)* 319, 101-104.
- Cohen-Matsliah, S.I., Brosh, I., Rosenblum, K., and Barkai, E. (2007). A novel role for extracellular signal-regulated kinase in maintaining long-term memory-relevant excitability changes. *J Neurosci* 27, 12584-12589.

- Cooper, L.N., Liberman, F., and Oja, E. (1979). A theory for the acquisition and loss of neuron specificity in visual cortex. *Biological cybernetics* 33, 9-28.
- Copi, A., Jungling, K., and Gottmann, K. (2005). Activity- and BDNF-induced plasticity of miniature synaptic currents in ES cell-derived neurons integrated in a neocortical network. *Journal of neurophysiology* 94, 4538-4543.
- Cormier, R.J., and Kelly, P.T. (1996). Glutamate-induced long-term potentiation enhances spontaneous EPSC amplitude but not frequency. *Journal of neurophysiology* 75, 1909-1918.
- Coulter, D.A., Lo Turco, J.J., Kubota, M., Disterhoft, J.F., Moore, J.W., and Alkon, D.L. (1989). Classical conditioning reduces amplitude and duration of calcium-dependent afterhyperpolarization in rabbit hippocampal pyramidal cells. *Journal of neurophysiology* 61, 971-981.
- Chen, L., Cai, W., Zhou, R., Furuya, K., and Sokabe, M. (2010). Modulatory metaplasticity induced by pregnenolone sulfate in the rat hippocampus: a leftward shift in LTP/LTD-frequency curve. *Hippocampus* 20, 499-512.
- D'Angelo, E. (2010). Homeostasis of intrinsic excitability: making the point. *The Journal of physiology* 588, 901-902.
- Daoudal, G., and Debanne, D. (2003). Long-Term Plasticity of Intrinsic Excitability: Learning Rules and Mechanisms. *Learning & Memory* 10, 456-465.
- Disterhoft, J.F., Golden, D.T., Read, H.L., Coulter, D.A., and Alkon, D.L. (1988). AHP reductions in rabbit hippocampal neurons during conditioning correlate with acquisition of the learned response. *Brain Res* 462, 118-125.
- Earnshaw, B.A., and Bressloff, P.C. (2008). Modeling the role of lateral membrane diffusion in AMPA receptor trafficking along a spiny dendrite. *Journal of computational neuroscience*.
- Echegoyen, J., Neu, A., Graber, K.D., and Soltesz, I. (2007). Homeostatic plasticity studied using in vivo hippocampal activity-blockade: synaptic scaling, intrinsic plasticity and age-dependence. *PLoS ONE* 2, e700.
- Engert, F., and Bonhoeffer, T. (1999). Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* 399, 66-70.
- Erreger, K., Dravid, S.M., Banke, T.G., Wyllie, D.J., and Traynelis, S.F. (2005). Subunit-specific gating controls rat NR1/NR2A and NR1/NR2B NMDA channel kinetics and synaptic signalling profiles. *The Journal of physiology* 563, 345-358.
- Escobar, M.L., Figueroa-Guzman, Y., and Gomez-Palacio-Schjetnan, A. (2003). In vivo insular cortex LTP induced by brain-derived neurotrophic factor. *Brain Res* 991, 274-279.
- Ferguson, A.R., Bolding, K.A., Huie, J.R., Hook, M.A., Santillano, D.R., Miranda, R.C., and Grau, J.W. (2008). Group I metabotropic glutamate receptors control metaplasticity of spinal cord learning through a protein kinase C-dependent mechanism. *J Neurosci* 28, 11939-11949.
- Fonseca, R., Vabulas, R.M., Hartl, F.U., Bonhoeffer, T., and Nagerl, U.V. (2006). A balance of protein synthesis and proteasome-dependent degradation determines the maintenance of LTP. *Neuron* 52, 239-245.
- Gainey, M.A., Hurvitz-Wolff, J.R., Lambo, M.E., and Turrigiano, G.G. (2009). Synaptic scaling requires the GluR2 subunit of the AMPA receptor. *J Neurosci* 29, 6479-6489.

- Gao, M., Sossa, K., Song, L., Errington, L., Cummings, L., Hwang, H., Kuhl, D., Worley, P., and Lee, H.K. (2010). A specific requirement of Arc/Arg3.1 for visual experience-induced homeostatic synaptic plasticity in mouse primary visual cortex. *J Neurosci* *30*, 7168-7178.
- Gomez-Palacio Schjetnan, A., and Escobar-Rodriguez, M.L. (2007). [Memory coding and retention: brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in synaptic plasticity]. *Rev Neurol* *45*, 409-417.
- Gong, B., Wang, H., Gu, S., Heximer, S.P., and Zhuo, M. (2007). Genetic evidence for the requirement of adenylyl cyclase 1 in synaptic scaling of forebrain cortical neurons. *The European journal of neuroscience* *26*, 275-288.
- Hardingham, G.E., and Bading, H. (2003). The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *Trends in neurosciences* *26*, 81-89.
- Hong, I., Kim, J., Lee, J., Park, S., Song, B., An, B., Park, K., Lee, H.W., Lee, S., Kim, H., *et al.* (2011). Reversible plasticity of fear memory-encoding amygdala synaptic circuits even after fear memory consolidation. *PLoS One* *6*, e24260.
- Huang, Y.Y., Colino, A., Selig, D.K., and Malenka, R.C. (1992). The influence of prior synaptic activity on the induction of long-term potentiation. *Science (New York, NY)* *255*, 730-733.
- Hubener, M., and Bonhoeffer, T. (2010). Searching for engrams. *Neuron* *67*, 363-371.
- Jedlicka, P. (2002). Synaptic plasticity, metaplasticity and BCM theory. *Bratislavske lekarske listy* *103*, 137-143.
- Jiang, B., Akaneya, Y., Ohshima, M., Ichisaka, S., Hata, Y., and Tsumoto, T. (2001). Brain-derived neurotrophic factor induces long-lasting potentiation of synaptic transmission in visual cortex in vivo in young rats, but not in the adult. *The European journal of neuroscience* *14*, 1219-1228.
- Jung, S.C., Kim, J., and Hoffman, D.A. (2008). Rapid, bidirectional remodeling of synaptic NMDA receptor subunit composition by A-type K<sup>+</sup> channel activity in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Neuron* *60*, 657-671.
- Knogler, L.D., Liao, M., and Drapeau, P. (2010). Synaptic scaling and the development of a motor network. *J Neurosci* *30*, 8871-8881.
- Liu, Y., Zhang, L.I., and Tao, H.W. (2007). Heterosynaptic scaling of developing GABAergic synapses: dependence on glutamatergic input and developmental stage. *J Neurosci* *27*, 5301-5312.
- Madronal, N., Gruart, A., Sacktor, T.C., and Delgado-Garcia, J.M. (2010). PKMzeta inhibition reverses learning-induced increases in hippocampal synaptic strength and memory during trace eyeblink conditioning. *PLoS ONE* *5*, e10400.
- Malenka, R.C. (1991). Postsynaptic factors control the duration of synaptic enhancement in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* *6*, 53-60.
- Marder, E., and Goaillard, J.M. (2006). Variability, compensation and homeostasis in neuron and network function. *Nature reviews* *7*, 563-574.
- Milner, B., Squire, L.R., and Kandel, E.R. (1998). Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron* *20*, 445-468.
- Monfils, M.H., and Teskey, G.C. (2004). Skilled-learning-induced potentiation in rat sensorimotor cortex: a transient form of behavioural long-term potentiation. *Neuroscience* *125*, 329-336.

- Nagerl, U.V., Kostinger, G., Anderson, J.C., Martin, K.A., and Bonhoeffer, T. (2007). Protracted synaptogenesis after activity-dependent spinogenesis in hippocampal neurons. *J Neurosci* 27, 8149-8156.
- Nelson, S.B., and Turrigiano, G.G. (2008). Strength through diversity. *Neuron* 60, 477-482.
- Nishiyama, M., Hong, K., Mikoshiba, K., Poo, M.M., and Kato, K. (2000). Calcium stores regulate the polarity and input specificity of synaptic modification. *Nature* 408, 584-588.
- O'Leary, T., van Rossum, M.C., and Wyllie, D.J. (2010). Homeostasis of intrinsic excitability in hippocampal neurones: dynamics and mechanism of the response to chronic depolarization. *The Journal of physiology* 588, 157-170.
- Pérez-Otaño, I., and Ehlers, M.D. (2005). Homeostatic plasticity and NMDA receptor trafficking. *Trends in neurosciences* 28, 229-238.
- Philpot, B.D., Cho, K.K., and Bear, M.F. (2007). Obligatory role of NR2A for metaplasticity in visual cortex. *Neuron* 53, 495-502.
- Philpot, B.D., Sekhar, A.K., Shouval, H.Z., and Bear, M.F. (2001). Visual experience and deprivation bidirectionally modify the composition and function of NMDA receptors in visual cortex. *Neuron* 29, 157-169.
- Pozo, K., and Goda, Y. (2010). Unraveling mechanisms of homeostatic synaptic plasticity. *Neuron* 66, 337-351.
- Quinlan, E.M., Lebel, D., Brosh, I., and Barkai, E. (2004). A molecular mechanism for stabilization of learning-induced synaptic modifications. *Neuron* 41, 185-192.
- Quinlan, E.M., Philpot, B.D., Hugarir, R.L., and Bear, M.F. (1999). Rapid, experience-dependent expression of synaptic NMDA receptors in visual cortex in vivo. *Nature neuroscience* 2, 352-357.
- Richter-Levin, G., and Maroun, M. (2010). Stress and amygdala suppression of metaplasticity in the medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 20, 2433-2441.
- Riout-Pedotti, M.S., Donoghue, J.P., and Dunaevsky, A. (2007). Plasticity of the synaptic modification range. *Journal of neurophysiology* 98, 3688-3695.
- Riout-Pedotti, M.S., Friedman, D., and Donoghue, J.P. (2000). Learning-induced LTP in neocortex. *Science (New York, NY)* 290, 533-536.
- Rodríguez-Duran, L.F., Castillo, D.V., Moguel-Gonzalez, M., and Escobar, M.L. (2011). Conditioned taste aversion modifies persistently the subsequent induction of neocortical long-term potentiation in vivo. *Neurobiology of Learning and Memory* 95, 519-526.
- Saar, D., Grossman, Y., and Barkai, E. (1998). Reduced after-hyperpolarization in rat piriform cortex pyramidal neurons is associated with increased learning capability during operant conditioning. *Eur J Neurosci* 10, 1518-1523.
- Sacktor, T.C. (2008). PKMzeta, LTP maintenance, and the dynamic molecular biology of memory storage. *Prog Brain Res* 169, 27-40.
- Sajikumar, S., Li, Q., Abraham, W.C., and Xiao, Z.C. (2009). Priming of short-term potentiation and synaptic tagging/capture mechanisms by ryanodine receptor activation in rat hippocampal CA1. *Learn Mem* 16, 178-186.

- Schjetnan, A.G., and Escobar, M.L. (2012). In vivo BDNF modulation of hippocampal mossy fiber plasticity induced by high frequency stimulation. *Hippocampus* 22, 1-8.
- Schroeder, B.W., and Shinnick-Gallagher, P. (2004). Fear memories induce a switch in stimulus response and signaling mechanisms for long-term potentiation in the lateral amygdala. *Eur J Neurosci* 20, 549-556.
- Schroeder, B.W., and Shinnick-Gallagher, P. (2005). Fear learning induces persistent facilitation of amygdala synaptic transmission. *The European journal of neuroscience* 22, 1775-1783.
- Schulz, D.J. (2006). Plasticity and stability in neuronal output via changes in intrinsic excitability: it's what's inside that counts. *The Journal of experimental biology* 209, 4821-4827.
- Shepherd, J.D., Rumbaugh, G., Wu, J., Chowdhury, S., Plath, N., Kuhl, D., Huganir, R.L., and Worley, P.F. (2006). Arc/Arg3.1 mediates homeostatic synaptic scaling of AMPA receptors. *Neuron* 52, 475-484.
- Smith, G.B., Heynen, A.J., and Bear, M.F. (2009). Bidirectional synaptic mechanisms of ocular dominance plasticity in visual cortex. *Philosophical transactions of the Royal Society of London* 364, 357-367.
- Sullivan, T.J., and de Sa, V.R. (2008). Sleeping our way to weight normalization and stable learning. *Neural Comput* 20, 3111-3130.
- Swensen, A.M., and Bean, B.P. (2005). Robustness of burst firing in dissociated purkinje neurons with acute or long-term reductions in sodium conductance. *J Neurosci* 25, 3509-3520.
- Taniike, N., Lu, Y.F., Tomizawa, K., and Matsui, H. (2008). Critical differences in magnitude and duration of N-methyl D-aspartate(NMDA) receptor activation between long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD) induction. *Acta medica Okayama* 62, 21-28.
- Toescu, E.C., and Vreugdenhil, M. (2010). Calcium and normal brain ageing. *Cell Calcium* 47, 158-164.
- Toni, N., Buchs, P.A., Nikonenko, I., Bron, C.R., and Muller, D. (1999). LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. *Nature* 402, 421-425.
- Turrigiano, G. (2011). Too many cooks? Intrinsic and synaptic homeostatic mechanisms in cortical circuit refinement. *Annual review of neuroscience* 34, 89-103.
- Turrigiano, G.G. (1999). Homeostatic plasticity in neuronal networks: the more things change, the more they stay the same. *Trends in neurosciences* 22, 221-227.
- Turrigiano, G.G. (2008). The self-tuning neuron: synaptic scaling of excitatory synapses. *Cell* 135, 422-435.
- Turrigiano, G.G., Leslie, K.R., Desai, N.S., Rutherford, L.C., and Nelson, S.B. (1998). Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature* 391, 892-896.
- Turrigiano, G.G., and Nelson, S.B. (2004). Homeostatic plasticity in the developing nervous system. *Nature reviews* 5, 97-107.
- Watt, A.J., van Rossum, M.C., MacLeod, K.M., Nelson, S.B., and Turrigiano, G.G. (2000). Activity coregulates quantal AMPA and NMDA currents at neocortical synapses. *Neuron* 26, 659-670.
- Whiting, B., Moiseff, A., and Rubio, M.E. (2009). Cochlear nucleus neurons redistribute synaptic AMPA and glycine receptors in response to monaural conductive hearing loss. *Neuroscience* 163, 1264-1276.

Yeung, L.C., Shouval, H.Z., Blais, B.S., and Cooper, L.N. (2004). Synaptic homeostasis and input selectivity follow from a calcium-dependent plasticity model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 14943-14948.

Young, J.Z., Isiegas, C., Abel, T., and Nguyen, P.V. (2006). Metaplasticity of the late-phase of long-term potentiation: a critical role for protein kinase A in synaptic tagging. *The European journal of neuroscience* *23*, 1784-1794.

Yu, L.M., and Goda, Y. (2009). Dendritic signalling and homeostatic adaptation. *Curr Opin Neurobiol* *19*, 327-335.

Zakharenko, S.S., Patterson, S.L., Dragatsis, I., Zeitlin, S.O., Siegelbaum, S.A., Kandel, E.R., and Morozov, A. (2003). Presynaptic BDNF required for a presynaptic but not postsynaptic component of LTP at hippocampal CA1-CA3 synapses. *Neuron* *39*, 975-990.

Zelcer, I., Cohen, H., Richter-Levin, G., Lebiosn, T., Grossberger, T., and Barkai, E. (2006). A cellular correlate of learning-induced metaplasticity in the hippocampus. *Cereb Cortex* *16*, 460-468.

Zhang, L., Kirschstein, T., Sommersberg, B., Merkens, M., Manahan-Vaughan, D., Elgersma, Y., and Beck, H. (2005). Hippocampal synaptic metaplasticity requires inhibitory autophosphorylation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II. *J Neurosci* *25*, 7697-7707.