



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**PLASTICIDAD HOMEOSTÁTICA EN LA NEOCORTEZA ADULTA: LTP Y
EXTINCIÓN DE UNA MEMORIA GUSTATIVA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ALEJANDRO RIVERA OLVERA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARTHA LILIA ESCOBAR RODRÍGUEZ
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. FEDERICO BERMÚDEZ RATTONI
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

DR. JOSÉ FERNANDO PEÑA ORTEGA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

Ciudad de México, Enero de 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**PLASTICIDAD HOMEOSTÁTICA EN LA NEOCORTEZA ADULTA: LTP Y
EXTINCIÓN DE UNA MEMORIA GUSTATIVA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ALEJANDRO RIVERA OLVERA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARTHA LILIA ESCOBAR RODRÍGUEZ
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. FEDERICO BERMÚDEZ RATTONI
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

DR. JOSÉ FERNANDO PEÑA ORTEGA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

Ciudad de México, Enero de 2018

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/840/2017

ASUNTO: Oficio de Jurado


Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 23 de octubre de 2017 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** del (la) alumno(a) **RIVERA OLVERA ALEJANDRO** con número de cuenta **305330633** con la tesis titulada "**Plasticidad homeostática en la neocorteza adulta: LTP y extinción de una memoria gustativa**", realizada bajo la dirección del (la) **DRA. MARTHA LILIA ESCOBAR RODRÍGUEZ**:

Presidente: DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE
Vocal: DR. JULIO EDUARDO ROQUE MORAN ANDRADE
Secretario: DR. FEDERICO BERMÚDEZ RATTONI
Suplente: DR. ROBERTO AGUSTÍN PRADO ALCALÁ
Suplente: DR. JOSÉ FERNANDO PEÑA ORTEGA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 1 de diciembre de 2017


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGNS/MJFM/ASR/grf*

Agradecimientos

El presente trabajo fue posible gracias al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM. Agradezco la formación de alta calidad que me brindó y las facilidades ofrecidas a lo largo de este proceso.

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico que me otorgó durante el desarrollo de mi maestría (No. de beca: 417634).

Asimismo, quiero agradecer al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT, IN215816) por los recursos concedidos para el desarrollo del presente trabajo.

A mi comité tutor por el invaluable apoyo que me brindaron a lo largo de este camino. Gracias por su confianza, su calidez y sus comentarios siempre dirigidos a la mejora de este trabajo y de mi formación como investigador...

...A mi tutora, Martha Lilia Escobar Rodríguez, por su inconmensurable apoyo. Gracias Dra., aún no encuentro las palabras para describir el agradecimiento tan grande que le tengo. Gracias por confiar en mí hace seis años y por ser tan paciente para guiarme a lo largo de este camino lleno de conocimiento y aprendizaje continuo. Gracias por escucharme en los momentos difíciles y por las enseñanzas personales y académicas que me regaló durante este tiempo.

Al doctor José Fernando Peña Ortega, por su amabilidad y confianza. Gracias por sus comentarios e ideas aportadas a mi trabajo. Gracias por alentar el desarrollo de mi proyecto y de mi persona.

Al doctor Federico Bermúdez Rattoni, por su supervisión y las valiosas aportaciones hechas a mi trabajo de investigación.

Agradecimientos a título personal

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi profundo agradecimiento por el inmenso apoyo que me ha brindado para desarrollarme académica y personalmente. Gracias por dejarme pertenecer a la universidad de la nación.

A los doctores Julio Morán y Roberto Prado, por su amabilísima atención y por ayudarme a mejorar este trabajo con sus valiosos comentarios.

Al M. V. Z. Gabriel Solano, por la provisión de las ratitas que fueron parte de este trabajo y por mantenerlas siempre bajo las mejores condiciones posibles permitidas por el bioterio de la Facultad de Psicología. ¡Gracias por su apoyo Doc!, por su amabilidad y por ser tan accesible conmigo.

*A los integrantes del laboratorio de Neurobiología del Aprendizaje y la Memoria de la Facultad de Psicología de la UNAM. Gracias por ser mi segunda familia y por hacerme sentir tan bien a lo largo de tanto tiempo.
Siempre me sentí como en casa...*

... A Luisito, gracias por tantas enseñanzas, por ser mi “sensei” y ayudarme a resolver un sinfín de dudas que se me presentaron durante este camino.

A Larita, por el grandísimo apoyo brindado durante todos esos momentos difíciles que pasé a lo largo de estos años. Gracias por escucharme y ayudarme de tantas formas.

A Yec, por tanta ayuda durante el desarrollo de distintos proyectos, seminarios, congresos, escritos. Gracias por tantos “bebetones”.

A “los nuevos”, Bety, Alfredo y Esteban, por su compañía, su apoyo y por hacerme sentir un buen maestro. Un agradecimiento especial a Tibi, Alf y Gamma por hacerme pasar ratos tan divertidos en el laboratorio, por ayudarme con los experimentos y por hacer tan cómodos los días de trabajo en el lab.

A Andrés Nieto, por todo el conocimiento, el apoyo académico y personal y las experiencias vividas. Gracias por expandir mi visión y por motivarme a ser mejor en este campo. Eres un gran ejemplo.

A Janikua y a la Dra. Gonsebatt, por ser parte fundamental en el desarrollo de este proyecto, gracias por abrirme las puertas de su laboratorio y por compartirme su conocimiento. Gracias por enseñarme la técnica de Western blot y por apoyarme a montar dicha técnica en nuestro laboratorio.

A Perlita, por tantísima ayuda a lo largo de todos estos años. Gracias por enseñarme a extraer corteza y por prestarme reactivos e insumos para llevar a cabo mi proyecto de maestría y algunos proyectos alternos que realicé.

A mis amigos, por acompañarme durante este largo proceso, por el tiempo, el apoyo, los consejos y los buenos momentos que me hicieron pasar. Gracias Jaz, Canek, Janin, Rodri, David, Valverde, Borre y Dalia.

A mis padres

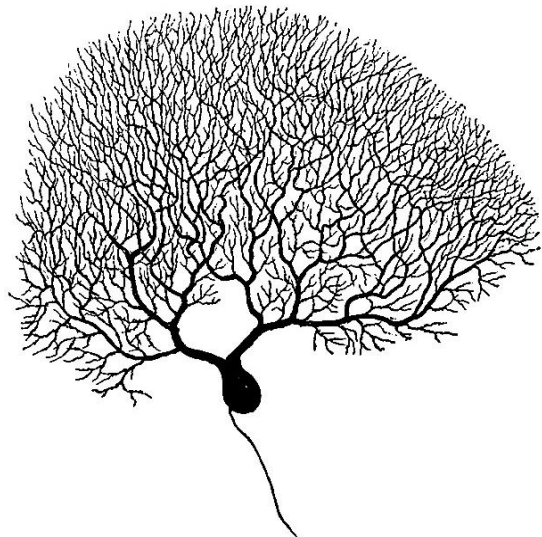
Lidia Olvera y Carlos Rivera, gracias por tanto. Este logro también es de ustedes.

Gracias por tu apoyo y cariño mamá, eres la luz que ilumina mi vida.

“Funes no sólo recordaba cada hoja de cada árbol de cada monte, sino cada una de las veces que la había percibido o imaginado...”

... Sospecho, sin embargo, que no era muy capaz de pensar. Pensar es olvidar diferencias, es generalizar, abstraer. En el abarrotado mundo de Funes no había sino detalles.”

Funes el memorioso | Jorge Luis Borges



ÍNDICE

I. RESÚMEN	1
II. ABSTRACT	2
III. INTRODUCCIÓN	3
1. La potenciación de largo plazo (LTP)	7
1.1. Características generales de la LTP.....	9
1.2. Mecanismos moleculares de la LTP	10
1.3. LTP en la neocorteza	15
2. El condicionamiento de aversión a los sabores (CAS)	18
3. La corteza insular y la vía gustativa	21
4. Extinción	26
5. LTP y conducta	32
6. Plasticidad homeostática	37
6.1. Metaplasticidad y escalamiento sináptico.....	37
6.2. Metaplasticidad y conducta	44
7. CAS y LTP en la corteza insular	46
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	48
V. OBJETIVOS	50
VI. METODOLOGÍA	51
Animales	51
Entrenamiento en el CAS	51
Inducción de la LTP en la CI	52
Curvas entrada-salida (I/O)	53
Histoquímica de Nissl	54
Ensayo de Western Blot	54
Análisis de datos	57
VII. RESULTADOS	60

a) Resultados histológicos.....	60
b) Resultados conductuales	61
c) Resultados electrofisiológicos	63
La extinción de CAS permite la inducción pero no el mantenimiento de la LTP en la vía BLA-CI in vivo.....	63
La extinción de CAS modifica la excitabilidad basal de la proyección BLA-CI.	66
d) Resultados moleculares	68
La extinción del CAS incrementa la expresión de CaN en la CI.....	68
VIII.....	DISCUSIÓN
70	
IX. CONCLUSIONES	78
X. LITERATURA CITADA	79
XI. ANEXO	102

I. RESÚMEN

Hoy en día se sabe que la historia de activación de las neuronas modula las respuestas futuras a determinados estímulos. En este sentido, se ha observado que la actividad neuronal es capaz de modificar el umbral para la inducción de subsecuente plasticidad sináptica y este fenómeno es conocido como metaplasticidad. Dicho fenómeno modula homeostáticamente la eficiencia de las conexiones sinápticas para mantener la actividad neuronal en un rango dinámico funcional y promover la estabilidad que es crucial para el almacenamiento de información. Aunado a esto, estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que el entrenamiento previo en el condicionamiento de aversión a los sabores (CAS) impide la subsecuente inducción de potenciación de largo plazo (LTP) en la proyección que va del núcleo basolateral amigdalino (BLA) hacia a la corteza insular (CI). Asimismo, hemos reportado que la inducción de LTP en la CI de manera previa al entrenamiento en el CAS modifica el proceso de extinción de esta tarea. La extinción de la memoria es un proceso que implica la formación de un nuevo trazo asociativo que inhibe la expresión de la memoria adquirida originalmente. Por otra parte, numerosas evidencias experimentales sugieren que la proteína fosfatasa calcineurina (CaN) está implicada en la extinción de diversas tareas conductuales. El objetivo del presente estudio fue explorar el efecto de la extinción del CAS en la posterior inducción de LTP en la vía BLA-CI *in vivo*, así como evaluar la participación potencial de CaN en este proceso. Para tal propósito, 48 h después de la extinción del CAS, los animales recibieron estimulación de alta frecuencia en el BLA con el fin de inducir LTP en la CI. Nuestros resultados mostraron que la extinción del CAS permite la inducción pero no el mantenimiento de la LTP en la CI, además de incrementar la expresión de CaN en esta región cortical. Estos hallazgos revelan que el entrenamiento en la extinción del CAS impide el mantenimiento de la LTP generada en la vía BLA-CI a través de un incremento en los niveles de CaN en dicha región, sugiriendo una regulación homeostática en esta vía.

II. ABSTRACT

Nowadays it is known that the history of activity of neurons modulates future responses to certain stimuli. In this respect, it has been observed that neuronal activity is able to modify the threshold for the induction of subsequent synaptic plasticity and this phenomenon is known as metaplasticity. Such phenomenon modulates homeostatically the efficiency of the synaptic connections to maintain the neuronal activity in a functional dynamic range and to promote the stability that is crucial for the storage of information. In addition, previous studies in our laboratory have shown that previous training in conditioned taste aversion (CTA) prevents the subsequent induction of long-term potentiation (LTP) in the projection from the basolateral nucleus of the amygdala (BLA) to the insular cortex (IC). Likewise, we have reported that the induction of LTP in the IC prior to training in the CTA modifies the extinction process of this task. Memory extinction is a process that involves the formation of a new associative trace that inhibits the expression of original memory. On the other hand, a body of evidence has suggested that protein phosphatase calcineurin (CaN) is involved in the extinction of several behavioral tasks. The aim of the present study was to explore the effect of CTA-extinction on the subsequent induction of LTP in the BLA-IC pathway *in vivo*, as well as the potential participation of CaN in this process. For this purpose, 48 h after the extinction of CTA, the animals received high frequency stimulation in BLA in order to induce LTP in the IC. Additionally, we evaluate the potential participation of CaN expression of CaN in this process. Our results showed that extinction of CTA allows the induction but not the maintenance of the LTP in the IC, in addition to increasing the expression of CaN in this region. These findings reveal that training in CTA-extinction prevents the maintenance of BLA-IC pathway-LTP through an increase in CaN levels in the IC, suggesting a homeostatic regulation in this pathway.

III. INTRODUCCIÓN

A lo largo del tiempo se ha tratado de comprender cómo la experiencia modifica el sistema nervioso para mantener la información y cambiar el repertorio conductual en función de las condiciones ambientales. Por ende, el estudio de las bases celulares y moleculares que subyacen al aprendizaje y la memoria ha sido uno de los objetivos de la neurociencia cognitiva durante las últimas décadas. Gracias al estudio de dichos fenómenos, a través de una variedad de niveles de análisis, se han logrado dilucidar algunos de los mecanismos que participan en el fortalecimiento de las conexiones sinápticas y, en consecuencia, en el almacenamiento de información (Lynch, 2004).

A principios del siglo pasado Santiago Ramón y Cajal propuso que los cambios en la fuerza de las conexiones sinápticas son un mecanismo que subyace al aprendizaje y la memoria (citado por Kandel, 2001), idea que en 1949 Donald Hebb integró en su modelo sináptico que postula que cuando “el axón de una célula A está suficientemente cerca para excitar a una célula B y repetida o persistentemente toma parte de su activación, algún cambio metabólico o estructural tiene lugar en alguna de las dos células, de modo que la eficacia en A para activar a B incrementa” (Hebb, 1949). Sin embargo, no fue hasta el descubrimiento de la potenciación de largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés) (Bliss y Lømo, 1973; Lømo, 1966) que existió evidencia experimental que apoyara tales propuestas.

Actualmente, la LTP representa un fenómeno importante para el estudio del repertorio de cambios plásticos que expresan las células del sistema nervioso y por ello es uno de los modelos experimentales más utilizados para estudiar fenómenos relacionados con el almacenamiento de información (Malenka y Bear, 2004; Nicoll, 2017). Sin embargo, para que la riqueza del aprendizaje y la memoria surjan de fenómenos plásticos, como la LTP y, su contraparte, la depresión de largo plazo (LTD, por sus siglas en inglés), deben existir mecanismos reguladores (Turrigiano, 2011; Viturera y Goda, 2013).

Al día de hoy, se conoce que el sistema nervioso posee la capacidad de mantener la actividad neuronal en un rango dinámico funcional gracias a un mecanismo de retroalimentación negativa que es capaz de mantener los cambios en la transmisión sináptica sin que el sistema experimente un estado de saturación o quiescencia. Tal mecanismo es conocido como plasticidad homeostática, y es un tipo de plasticidad no hebbiana (Pozo y Goda, 2010).

En este sentido, se ha reportado que la adquisición de un aprendizaje aversivo es capaz de modificar la capacidad de expresar subsecuente LTP tanto en el hipocampo (Hirata et al., 2009, Xu et al., 2014) como en la neocorteza (Rivera-Olvera, Rodríguez-Durán y Escobar, 2016; Rodríguez-Durán y Escobar, 2014; Rodríguez-Durán, Martínez-Moreno y Escobar, 2017).

La corteza insular (CI), o corteza gustativa, es una región de la neocorteza temporal involucrada en el procesamiento de varios paradigmas de aprendizaje, entre los que se encuentra el condicionamiento de aversión a los sabores (CAS), un

paradigma ampliamente utilizado para el estudio de procesos de aprendizaje y memoria que implica la supervivencia y adaptación de las especies (Bermúdez-Rattoni, 2004; Bermúdez-Rattoni, 2014). Dicha región neocortical juega un papel importante en la adquisición, almacenamiento y extinción del CAS (Bermúdez-Rattoni, Nuñez-Jaramillo y Balderas, 2005).

El proceso de extinción consiste en el decaimiento en frecuencia e intensidad de una respuesta condicionada debido a la presentación repetida del estímulo condicionado (EC) en ausencia del estímulo incondicionado (EI) (Quirk y Mueller, 2008; Rescorla 2001). Mientras que algunos autores han propuesto que la extinción estaría dada por una destrucción o borrado de la asociación original (EC–EI) (Rescorla y Wagner, 1972 citado por Bouton, 2004), diversas evidencias experimentales respaldan la visión actual que propone que dicho proceso no consistiría en una pérdida u olvido de esta asociación original, sino en la adquisición de un nuevo aprendizaje en el que el EC no predice la aparición del EI (Bouton, 2004; Maren, 2011; Maroun, Kavushansky, Holmes, Wellman y Motanis, 2012; Myers y Davis, 2002). Aunado a lo anterior, se han encontrado ciertas coincidencias en los eventos celulares y moleculares que subyacen a la consolidación de la memoria de extinción y la memoria original (Lu, Walker y Davis, 2001, Santini, Muller y Quirk, 2001). No obstante, algunos trabajos en los que se estudian los mecanismos de la extinción han mostrado la ocurrencia de eventos moleculares antagónicos a los que ocurren durante la adquisición y consolidación del trazo de memoria original, tales como la depotenciación sináptica y la activación de la

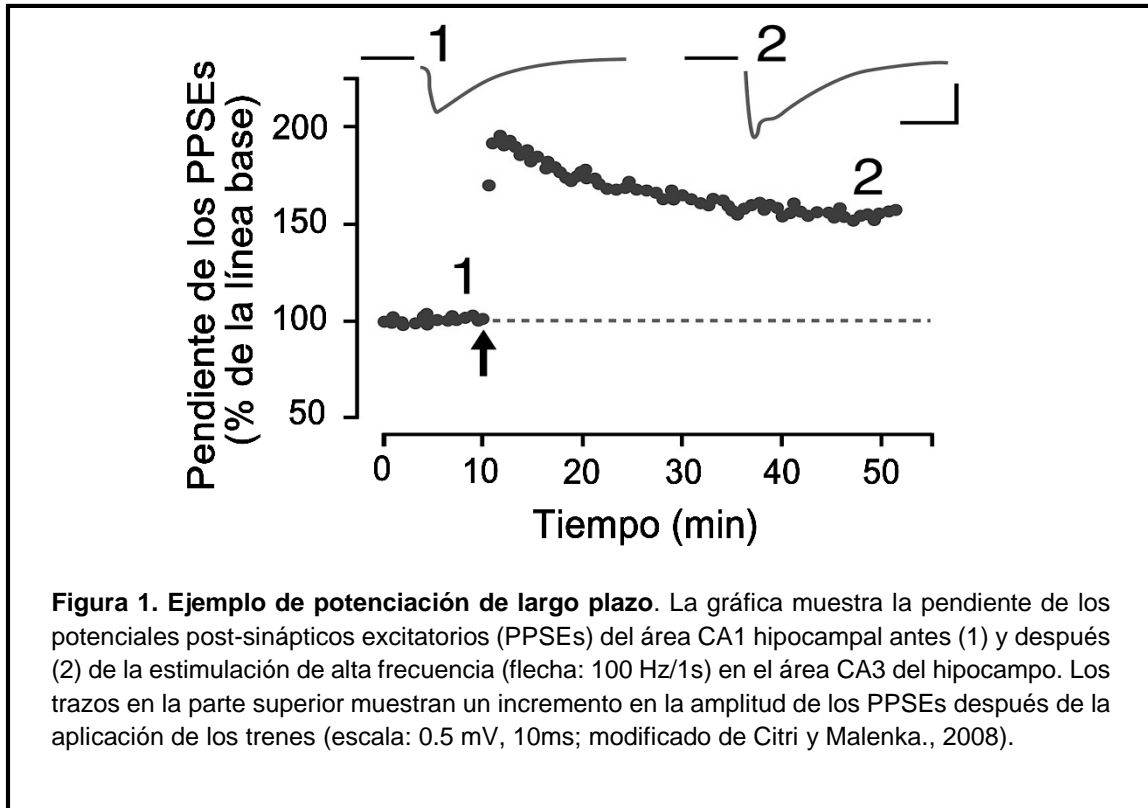
proteína fosfatasa calcineurina (CaN) (Lin, Lee y Gean, 2003a; Lin et al., 2003b; Lin, Yeh, Lu y Gean, 2003c).

Por otra parte, en estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo de trabajo, hemos reportado que la inducción de LTP en la CI de manera previa al entrenamiento en el CAS es capaz de modificar la extinción de esta tarea (Escobar y Bermudez-Rattoni, 2000). Asimismo, nuestras investigaciones han demostrado que el entrenamiento en el CAS bloquea la subsecuente inducción de LTP, generada, ya sea por estimulación de alta frecuencia (Rodríguez-Durán, Castillo, Moguel-González y Escobar, 2011; Rodríguez-Durán y Escobar, 2014) o bien por la microinfusión del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés) (Rivera-Olvera et al., 2016) en la CI de los animales entrenados. Sin embargo, desconocemos el papel que juega la extinción del CAS en la regulación homeostática de la plasticidad sináptica en la CI.

1. La potenciación de largo plazo (LTP)

Una de las características más notables del cerebro es su capacidad para almacenar grandes cantidades de información. La memoria se ve 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).

A finales de los años 60 y principios de la década de los 70's, Tim Bliss y Terje Lømo realizaron una serie de experimentos describiendo que breves trenes de estimulación de alta frecuencia aplicados en la proyección que emerge de la vía perforante hacia el giro dentado del hipocampo de conejos, causaban un incremento en la fortaleza de las conexiones sinápticas (Lømo, 1966; Bliss y Gardner-Medwin, 1973; Bliss y Lømo, 1973). Dicho fenómeno fue denominado como potenciación de 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; Nicoll, 2017). Hoy en día se conoce que es posible inducir LTP en prácticamente todas las áreas del sistema nervioso (Abraham, 2008; Citri y Malenka, 2008; Nicoll, 2017), además de presentarse en diversas especies de animales, como en conejos, gatos, ratas, ratones, invertebrados e incluso en humanos (Abraham, 2008; Citri y Malenka, 2008; Dringenberg, Oliveira y Habib, 2008; Kitagawa et al., 2004; Muller, Orekhov, Liu, Ziemann, 2007; Otsubo, Maekawa, Nagai, Sakio, Hori, 2008; Roberts y Glanzman, 2003).



Inicialmente la LTP fue reportada en el hipocampo, desde entonces se ha encontrado que dicho fenómeno no es particular de una vía ni tampoco de una sola área del sistema nervioso central (SNC); por ejemplo, en el hipocampo además del patrón perforante (Bliss y Lømo, 1973) el fenómeno se ha reportado en las colaterales de Schaffer (Abraham y Hugett, 1997; Wang y Stelzer, 1996) y en las fibras musgosas (Derrick, Weinberger y Martinez, 1991; Nicoll y Malenka, 1995; Escobar, Barea-Rodríguez, Derrick, Reyes y Martinez, 1997). Entre las áreas no hipocampales donde se ha reportado la expresión de la LTP se encuentran las siguientes vías: tálamo auditivo-amígdala (Clugnet, Ledoux y Morrison, 1990), fibras paralelas-neuronas de Purkinje en el cerebelo (Losi, Prybylowski, Fu, Lou y Vicini,

2002), cortico-estriatal (Calabresi et al., 2000), y varias regiones de la neocorteza (Escobar, Alcocer y Chao, 1998a; Hasan et al., 2013; He et al., 2015; Rioult-Pedotti, Friedman y Donoghue, 2000; Sheynikhovich, Otani y Arleo, 2013).

Se considera que la LTP es el reflejo de los procesos celulares que ocurren durante la transmisión sináptica normal y que subyace a los cambios sinápticos durante la formación de la memoria. Es claro que la LTP puede presentarse en muchas sinapsis del sistema nervioso. Por otra parte, numerosas formas de LTP involucran la activación de los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), sin embargo, estos no siempre son requeridos (Escobar et al., 1997). Además, los mecanismos implicados en la inducción de la LTP difieren en función de la estructura cerebral estimulada. Por lo tanto, se considera que la potenciación de largo plazo de la transmisión sináptica excitatoria es una propiedad intrínseca de las redes neuronales, que utilizan distintos mecanismos de inducción y posiblemente de expresión en diferentes poblaciones sinápticas (Escobar y Derrik, 2007; Malenka y Bear, 2004; Nicoll, 2017).

1.1. Características generales de la LTP

Además de su persistencia en el tiempo, la LTP posee características que la convierten en el principal fenómeno para explicar los eventos que a nivel celular y molecular subyacen a la plasticidad sináptica relacionada con la memoria (Nicoll, 2017). Estas características son: 1) la especificidad, 2) la cooperatividad y 3) la

asociatividad (Bailey, Giustteton, Huang, Hawkins y Kandel, 2000) (Figura 2). La especificidad se refiere a que únicamente aquellas fibras que fueron activadas por el estímulo de alta frecuencia van a presentar modificaciones en la respuesta sináptica. La cooperatividad se manifiesta por un fuerte requerimiento en la actividad simultánea de las fibras presinápticas, de tal forma que se logre el estímulo necesario para generar la LTP. Finalmente, la asociatividad se presenta cuando la actividad de una aferencia lo suficientemente fuerte como para presentar LTP, puede ayudar a generar tal fenómeno en sinapsis débiles (incapaces de generar LTP por si mismas), siempre y cuando la actividad de las dos aferencias ocurra simultáneamente (Malenka, 2003; Malenka y Nicoll, 1993). La relación de este fenómeno con el procesamiento de información ha sido extensamente estudiada en el hipocampo y otras regiones del SNC, y algunos de los puntos que hacen pensar a los investigadores que la LTP constituye el mecanismo que subyace a los procesos de aprendizaje y memoria son que la LTP opera en las redes de neuronas involucradas en los procesos de aprendizaje y memoria (hipocampo, amígdala, neocorteza etc.), y que la duración prolongada del fenómeno así como su funcionamiento ocurren acorde al postulado de Hebb (Martínez y Derrik, 1996; Nicoll, 2017).

1.2. Mecanismos moleculares de la LTP

Entre los mecanismos moleculares que subyacen a la LTP se ha descrito la participación del neurotransmisor excitador glutamato. El glutamato activa a los

receptores ionotrópicos AMPA (ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico), dando lugar a la entrada del ion sodio al interior de la célula, contribuyendo de esta forma a la despolarización de la neurona postsináptica. De igual forma, los receptores NMDA, también ionotrópicos, son activados por glutamato, sin embargo, éstos poseen un bloqueo en el poro del canal, debido a la presencia de un ion de magnesio, el cual es liberado cuando la membrana es despolarizada. Esto otorga a los receptores NMDA la propiedad de funcionar como detectores asociativos, ya que se activan sólo cuando coinciden la actividad de la célula presináptica y la despolarización de la membrana en la célula postsináptica (Malenka y Bear, 2004). Los receptores NMDA tienen la característica de que, al ser activados, además de sodio, permiten también la entrada de calcio al interior de la célula (Ascher, Bregestovski y Nowak, 1988; Jahr y Stevens, 1987). El incremento en las concentraciones de calcio desencadenado por la inducción de LTP conlleva a la activación de la proteína citosólica llamada calmodulina, la cual funciona como una señal al activar distintas vías de traducción en el interior de la célula, haciendo posible el mantenimiento del incremento en la eficiencia sináptica por tiempos prolongados (Malenka y Bear, 2004).

Se ha observado que un mecanismo importante en la generación de la LTP, es la activación de varias proteínas cinasas (las cuales se caracterizan por transferir un grupo fosfato a sus substratos). Entre estas cinasas destaca la actividad de la calcio calmodulina cinasa de tipo II (CaMK-II), la cual fosforila a los receptores AMPA y NMDA (Sanhueza y Lisman, 2013). (Figura 3) (Malenka y Bear, 2004).

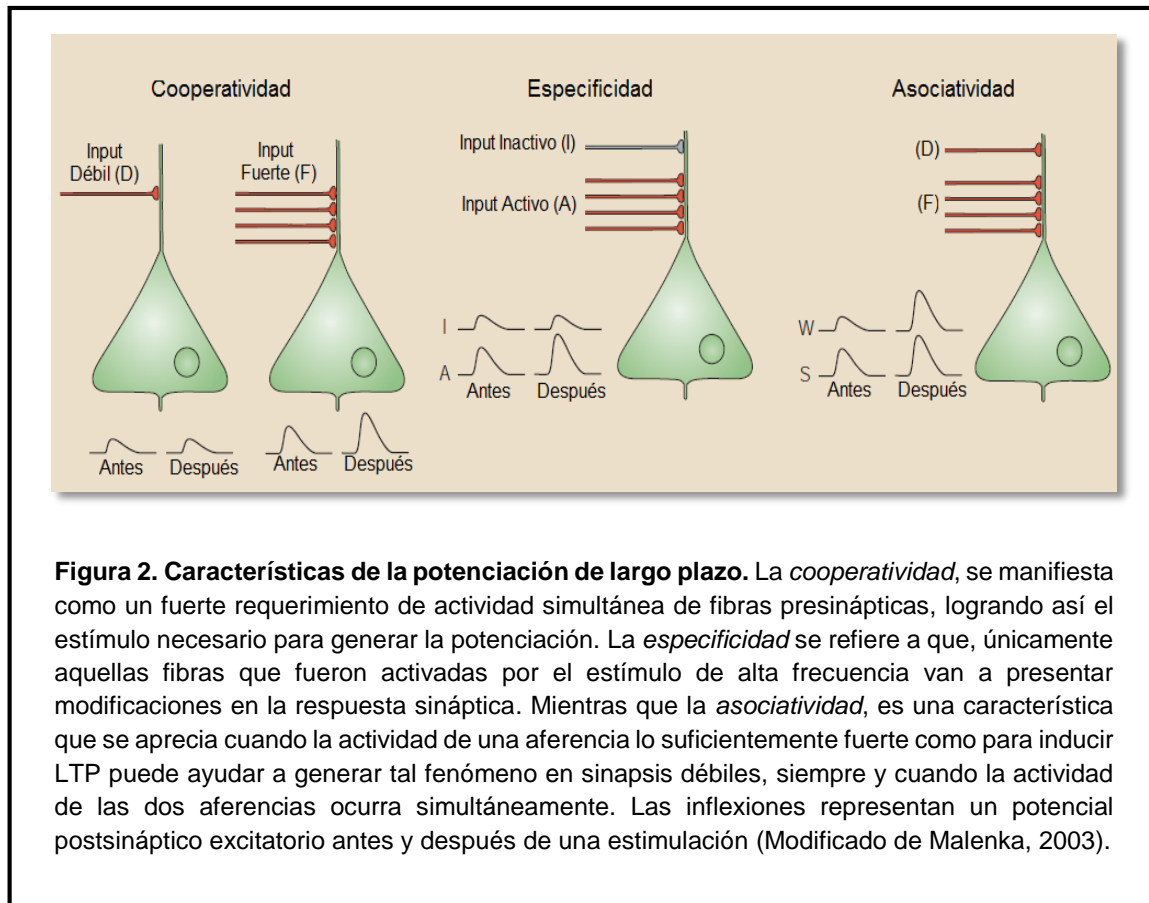


Figura 2. Características de la potenciación de largo plazo. La *cooperatividad*, se manifiesta como un fuerte requerimiento de actividad simultánea de fibras presinápticas, logrando así el estímulo necesario para generar la potenciación. La *especificidad* se refiere a que, únicamente aquellas fibras que fueron activadas por el estímulo de alta frecuencia van a presentar modificaciones en la respuesta sináptica. Mientras que la *asociatividad*, es una característica que se aprecia cuando la actividad de una aferencia lo suficientemente fuerte como para inducir LTP puede ayudar a generar tal fenómeno en sinapsis débiles, siempre y cuando la actividad de las dos aferencias ocurra simultáneamente. Las inflexiones representan un potencial postsináptico excitatorio antes y después de una estimulación (Modificado de Malenka, 2003).

Entre los mecanismos que se han visto involucrados en el mantenimiento de la LTP por períodos prolongados se encuentran la síntesis de proteínas, así como, las modificaciones estructurales que dan origen a nuevos contactos sinápticos (Lamprecht y LeDoux, 2004). Una de las cascadas involucradas en la síntesis de proteínas es la que tiene lugar tras la activación de la proteína cinasa A (PKA). La unidad catalítica de esta proteína transloca al núcleo y una vez en el interior activa al factor de transcripción CREB (proteína de unión al elemento responsivo al AMPc), que regula la transcripción de genes. La LTP tardía (L-LTP, por *late LTP*) se ha visto involucrada en la producción de proteínas de adhesión celular, así como la polimerización de actina, responsables de las modificaciones

estructurales y formación de nuevos contactos sinápticos (Kelleher, Govindarajan, Jung, Kang y Tonegawa, 2004). Asimismo, la proteína cinasa C (PKC), la cual es activada por calcio y diacilglicerol, ha sido involucrada en los fenómenos de plasticidad sináptica como la LTP (Moriguchi, Han, Nakagawasai, Tadano y Fukunaga, 2006; Taattola, 2004; Yang et al., 2004). Uno de los sustratos de esta cinasa es la subunidad del receptor AMPA GluR1, la cual al ser fosforilada promueve la incorporación de dicha subunidad a la sinapsis (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 y Fallon, 2000). Es pertinente mencionar que la síntesis de proteínas no sólo 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 (Citri y Malenka, 2008; Engert y Bonhoeffer, 1999; Malenka y Bear, 2004; Toni, Buchs, Nikonenko, Bron y Muller, 1999; Wells y Fallon, 2000). 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 y Bonhoeffer, 1999; Toni et al., 1999).

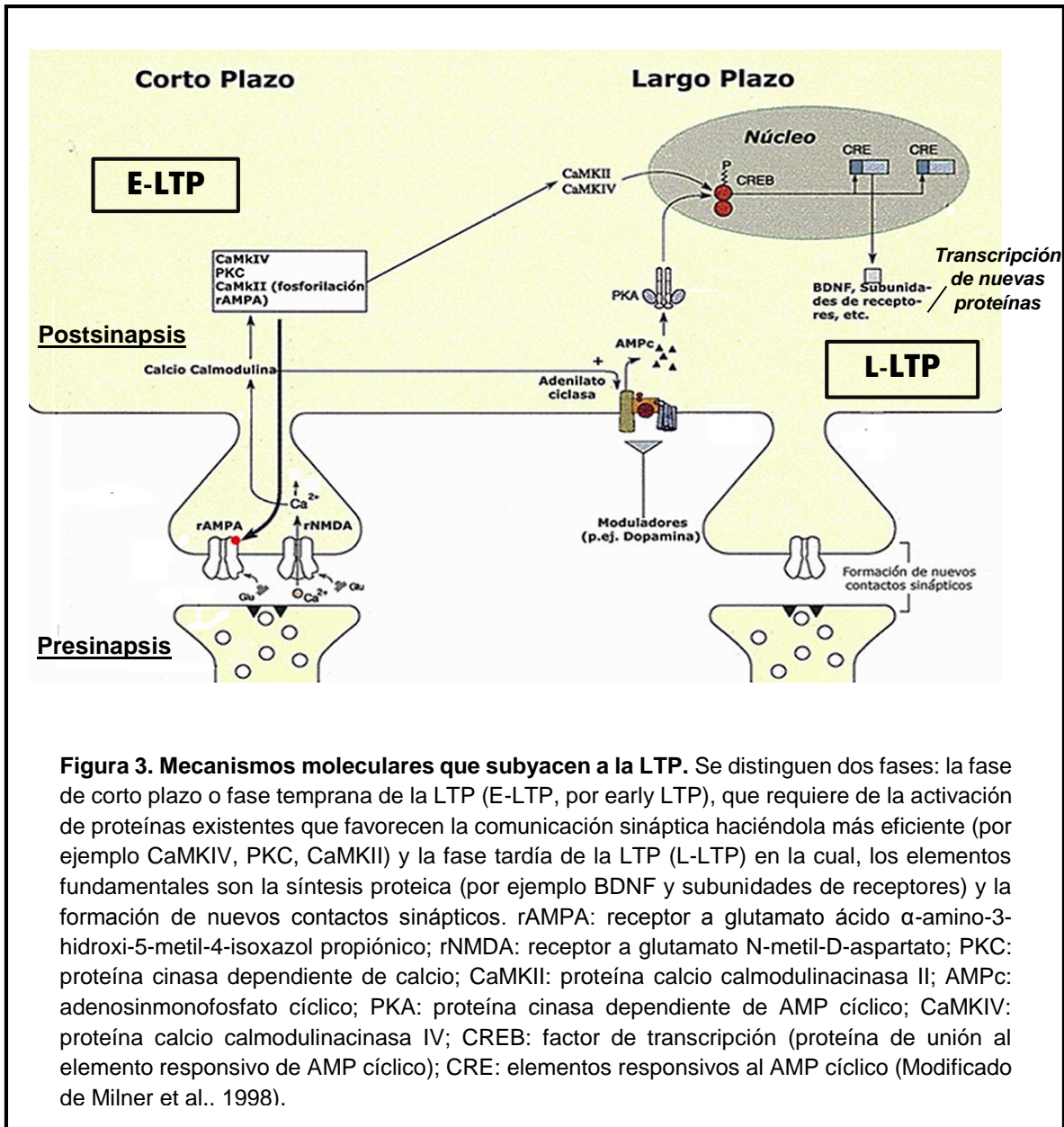


Figura 3. Mecanismos moleculares que subyacen a la LTP. Se distinguen dos fases: la fase de corto plazo o fase temprana de la LTP (E-LTP, por early LTP), que requiere de la activación de proteínas existentes que favorecen la comunicación sináptica haciéndola más eficiente (por ejemplo CaMKIV, PKC, CaMKII) y la fase tardía de la LTP (L-LTP) en la cual, los elementos fundamentales son la síntesis proteica (por ejemplo BDNF y subunidades de receptores) y la formación de nuevos contactos sinápticos. rAMPA: receptor a glutamato ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico; rNMDA: receptor a glutamato N-metil-D-aspartato; PKC: proteína cinasa dependiente de calcio; CaMKII: proteína calcio calmodulinacinasa II; AMPc: adenosinmonofosfato cíclico; PKA: proteína cinasa dependiente de AMP cíclico; CaMKIV: proteína calcio calmodulinacinasa IV; CREB: factor de transcripción (proteína de unión al elemento responsive de AMP cíclico); CRE: elementos responsivos al AMP cíclico (Modificado de Milner et al.. 1998).

En estudios recientes se ha destacado la importancia de los factores neurotróficos en la LTP. Por ejemplo, se ha observado que la expresión de los genes que codifican para los factores de crecimiento BDNF, factor de crecimiento nervioso (NGF, por sus siglas en inglés) y neurotrofina 3 (NT-3) incrementa tras la inducción de la LTP (Bramham, Southard, Sarvey, Herkenham y Brady, 1996; Morimoto, Sato,

Sato, Yamada y Hayabara, 1998). El aumento de la transcripción de genes que codifican factores de crecimiento, así como moléculas de adhesión celular podría constituir la conexión entre el incremento en la eficacia sináptica y las modificaciones estructurales de los sitios sinápticos que se han observado tras la inducción de LTP (De Roo, Klauser, García, Pogliá y Mueller, 2008).

1.3. LTP en la neocorteza

Como se indicó en líneas anteriores, la LTP fue inicialmente descrita en el hipocampo, una estructura implicada en diversas formas de aprendizaje y memoria. Sin embargo, la neocorteza es considerada la región en la que se almacena la memoria de largo plazo (Bear, Connors y Paradiso, 2001). Adicionalmente, se considera que dicho fenómeno es un factor clave para el desarrollo dependiente de la actividad en los circuitos neocorticales (An, Yang, Sun, Kilb y Luhmann, 2012), por lo que el estudio de la LTP en la neocorteza resulta de gran interés para el campo de la neurociencia cognitiva. No obstante, los trabajos encaminados al estudio de la LTP en dicha región, han enfrentado una complejidad mayor. Los trabajos realizados en esta área han utilizado una extensa variedad de protocolos de estimulación, que pueden incluir una reducción de la inhibición modulada por el receptor al ácido γ -aminobutírico (GABA) (Kanter y Haberly, 1993), o la utilización de inyecciones de corriente en el cuerpo celular, para generar potenciales de acción en reversa que permitan la depolarización postsináptica necesaria para inducir LTP (Feldman, 2012). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que la LTP in vivo

en la corteza somatosensorial del ratón se puede generar en ausencia de dichas espigas somáticas, requiriendo en lugar de ello, la generación de depolarizaciones dendríticas locales de larga duración (Gambino et al., 2014). Estas evidencias nos muestran un panorama general de la gran complejidad que han debido enfrentar diversos investigadores para la inducción de la LTP en la neocorteza. Otro ejemplo de tal complejidad es el caso de la corteza visual del gato, en la que parece existir una correlación entre la edad y la capacidad de inducir LTP (Bear y Kirkwood, 1993; Espinosa y Stryker, 2010; Kirkwood, Lee y Bear, 1995), además de la necesidad de ampliar el rango de frecuencia y el número de estimulaciones tetánicas para producir el fenómeno. Entre las áreas neocorticales que se ha reportado que presentan el fenómeno de LTP se encuentran la corteza primaria visual del gato (Komatsu, Fuji, Maedan, Sakaguchi y Tomaya, 1988), de la rata (Hager et al., 2015) y del ratón (Guo et al., 2017), la corteza auditiva del ratón (Chun, Bayazitov, Blundon y Zakharenko, 2013), la corteza de barriles en la rata (An et al., 2012; Barros-Zulaica, Castejon y Nuñez, 2014), la corteza somatosensorial de la rata (Feldman, 2000) y del ratón (Gambino et al., 2014), la corteza cingulada anterior del ratón (Chen et al., 2014), la corteza prefrontal de la rata (Hirsch y Crepel, 1990; Shen y Kalivas, 2013) y del ratón (Ruan, Saur y Yao, 2014), la corteza prefrontal infralímbica del ratón (Marek et al., 2011), la corteza piriforme anterior de la rata (Morrison, Fontaine, Harley y Yuan, 2013), la corteza entorrinal de la rata (Quinlan, Lebel, Brosh y Barkai, 2004), la corteza somatosensorial y motora de rata (Rioult-Pedotti et al., 2000), la corteza motora en el humano, a través de estimulación magnética transcraneal (Naro et al., 2014) y la corteza insular de la rata,

específicamente en la vía que va del núcleo basolateral amigdalino (BLA, por sus siglas en inglés) hacia la CI (Escobar et al.,1998a; Jones, French, Bliss y Rosenblum, 1999; Rodríguez-Durán, Martínez-Moreno y Escobar; 2017).

2. El condicionamiento de aversión a los sabores (CAS)

La supervivencia de un organismo está basada entre otras cosas en la capacidad de aprender y recordar que un alimento ingerido fue seguido de un malestar, 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 éstas son seguidas por la aplicación de rayos gamma (García, Kimeldorf y Koelling, 1955). En posteriores experimentos del mismo grupo de investigación, el estímulo aversivo utilizado fue el LiCl. En este sentido, García y Koelling 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 (García y Koelling, 1966). A esta conducta de rechazo basada en el aprendizaje se le llamó condicionamiento de aversión a los sabores o CAS (Figura 4). El CAS es un tipo de condicionamiento clásico, 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 (RC). Los animales presentan el aprendizaje de la tarea cuando el estímulo aversivo es inyectado por vía intraperitoneal o intravenosa (Bradley y Mistretta, 1971; Bures y Buresova, 1989).

Los principios generales del condicionamiento de aversión a los sabores son:

- a) 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, Lasiter, Bermúdez-Rattoni y Deems, 1985).
- b) 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 EC y el EI sea de segundos (Domjan, 1985).
- c) Los estímulos gustativos se asocian más fácilmente a estímulos gástricos (Garcia y 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, estas lesiones en la CI no parecen afectar la percepción del sabor, ya que los animales con lesión en la CI pueden discriminar entre diferentes concentraciones de sacarosa y cloruro de sodio (Lasiter, Deems, Oetting y García, 1985). Estudios electrofisiológicos mediante estimulación gustativa y evocación de señales de la lengua a la corteza insular sugieren que los estímulos gustativos están confinados a la CI (Bermúdez-Rattoni, 2004; Bermúdez-Rattoni et al., 2005; Bernstein y 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

circuitos neuronales en la CI (Grossman, Fontanini, Wieskopf y Katz, 2008; Yamamoto, Matsuo, Kiyomitsu y Kitamura, 1989). 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 y Koh, 2007) e incluso modifica los mapas sensoriales de la CI en ratas (Accolla y Carleton, 2008). Además, la CI también se ha visto involucrada en otras tareas de aprendizaje de tipo aversivo, como la prevención pasiva (Bermúdez-Rattoni y McGaugh, 1991; Bermúdez-Rattoni, 2004; Escobar, Fernandez, Guevara-Aguilar y Bermúdez-Rattoni, 1989).

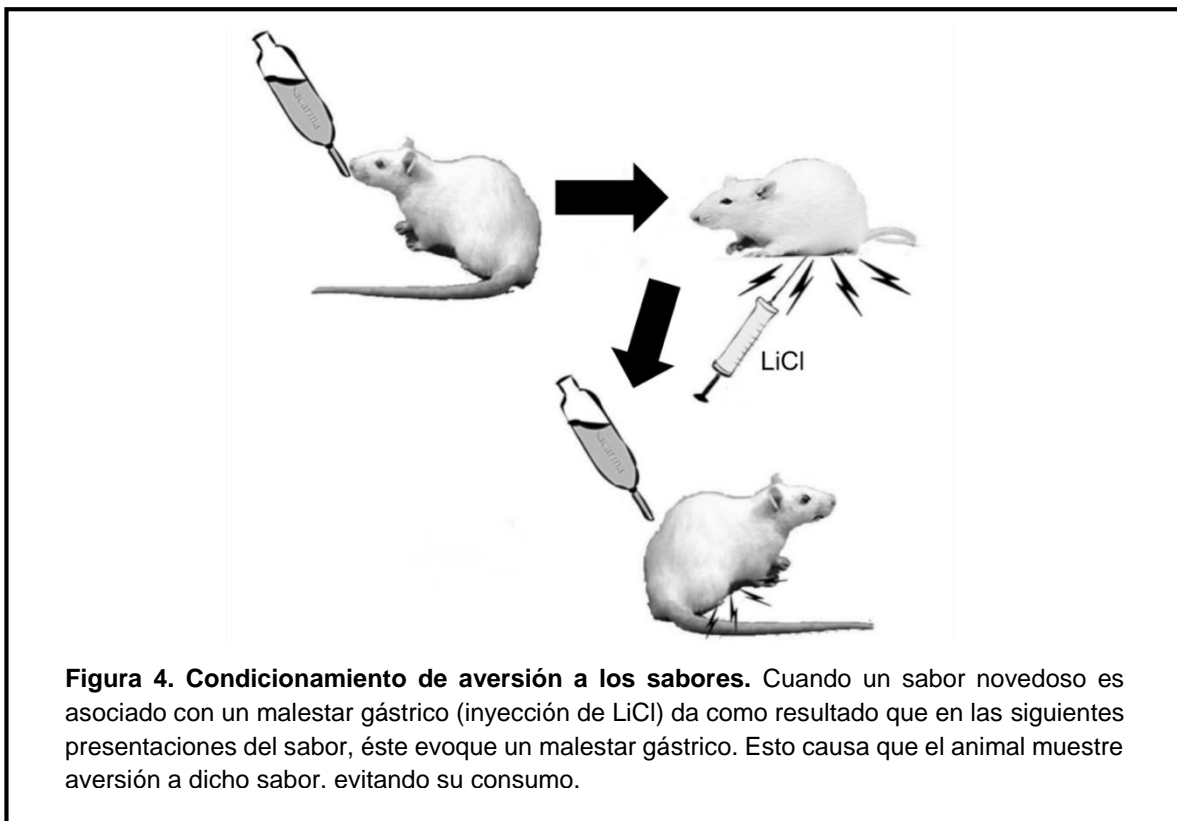


Figura 4. Condicionamiento de aversión a los sabores. Cuando un sabor novedoso es asociado con un malestar gástrico (inyección de LiCl) da como resultado que en las siguientes presentaciones del sabor, éste evoque un malestar gástrico. Esto causa que el animal muestre aversión a dicho sabor. evitando su consumo.

3. La corteza insular y la vía gustativa

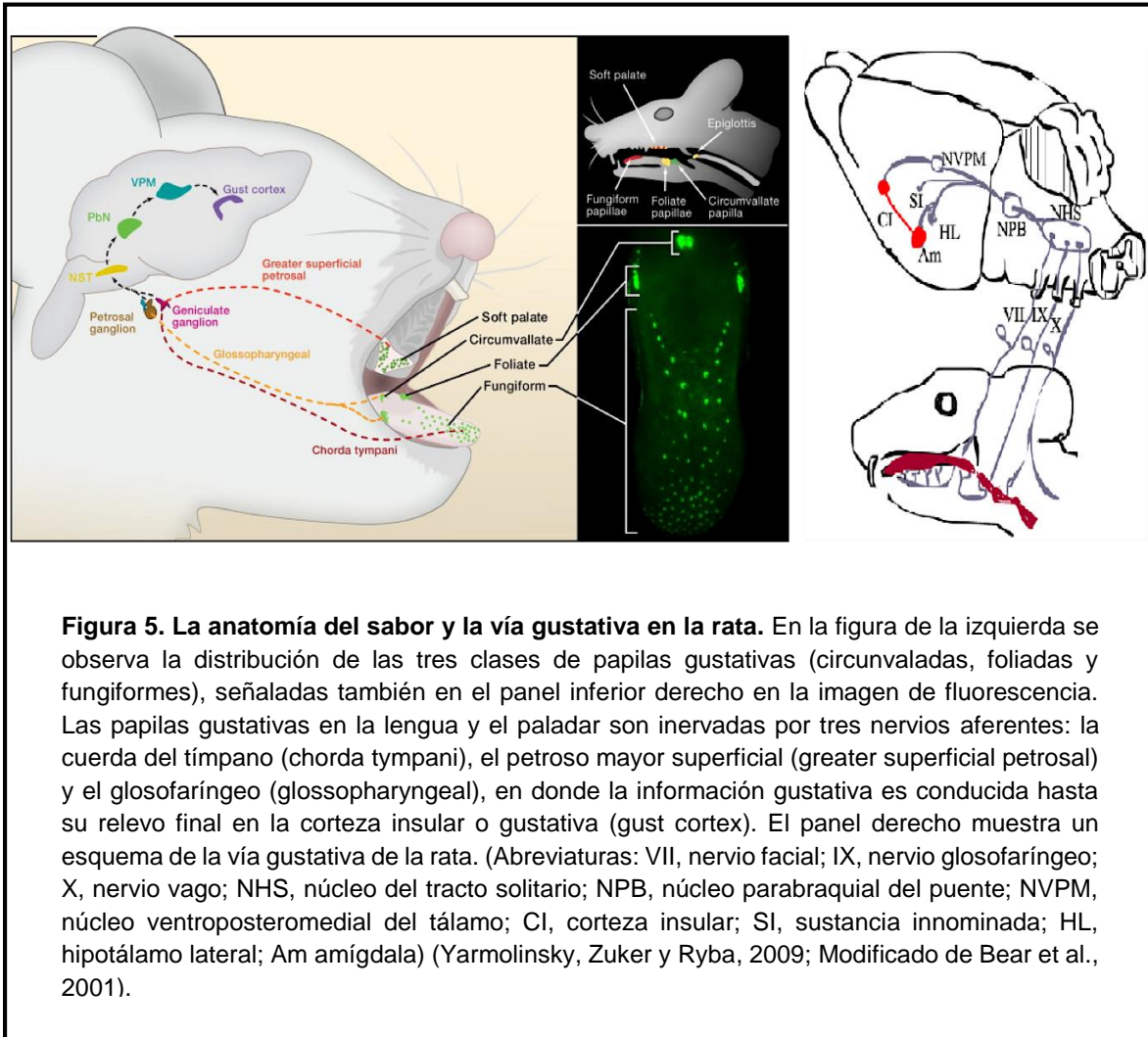
La CI es el relevo final de la vía gustativa. Los vertebrados detectamos los sabores por medio de la activación de células quimiorreceptoras las cuales responden a moléculas o iones que están disueltos en la saliva. Estas células, junto con células basales y de soporte forman las yemas gustativas. Éstas 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 (Figura 5) (Bear, 1996).

Los pares craneales VII (facial), IX (glossofaríngeo), y X (vago) llevan información de las yemas gustativas (Reutter y Witt, 1993) (Figura 5). El nervio facial lleva información de las papilas fungiformes que se encuentran en la parte anterior de la lengua, así como de las yemas gustativas localizadas en el paladar y en el conducto nasoincisor. Por su parte, 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 laringe y esófago. Por otra parte, el nervio trigémino inerva la periferia de las yemas gustativas y transmite información somatosensorial, de textura y

temperatura de los alimentos (Reutter y Witt, 1993). Los tres nervios, facial, glossofaríngeo y vago, hacen sinapsis en el núcleo del tracto 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 y Leonard, 1971). Una vez ahí se reconocen dos rutas: la primera se proyecta hacia estructuras ventrales del cerebro basal como la amígdala, la zona ventral del hipocampo, y la sustancia innominada mientras que la segunda se proyecta hacia el complejo ventrobasal del tálamo, el cual se comunica con la CI (Gerfen y Clavier, 1979). En el humano las fibras eferentes provenientes del núcleo del tracto 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 y 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 (Kinomura et al., 1994; Pritchard, Hamilton, Morse y Norgren, 1986)

Es importante señalar que el núcleo del tracto solitario recibe aferencias 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 a la CI (Yamamoto et al., 1992). Por ejemplo, un estudio electrofisiológico demostró la activación de la CI cinco minutos después de una inyección de cloruro de litio (LiCl) (Weiner et al., 1994). Asimismo, también es importante considerar las conexiones recíprocas que existen entre la CI y la

amígdala, una estructura cerebral relacionada al procesamiento de tareas aversivas como el condicionamiento al miedo y la prevención pasiva, así como con respuestas emocionales como el miedo y la agresión (McGaugh, Castellano y Brioni, 1990; LeDoux, 1993).



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 esta corteza con el núcleo basalis magnocelularis (Bermúdez-Rattoni, 2004; Bermúdez-Rattoni et al., 2005). 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 la cinasa regulada por señal extracelular (ERK) (Bermúdez-Rattoni, 2004; Bermúdez-Rattoni et al., 2005). Por otro lado, con respecto a 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 PKC o la PKA, que son parte de una cadena molecular que culmina con la activación de factores de transcripción como CREB, los cuales promueven la síntesis de nuevas proteínas relacionadas con el mantenimiento de la memoria del CAS (Yasoshima, Morimoto y Yamamoto, 2000; Bermúdez-Rattoni,

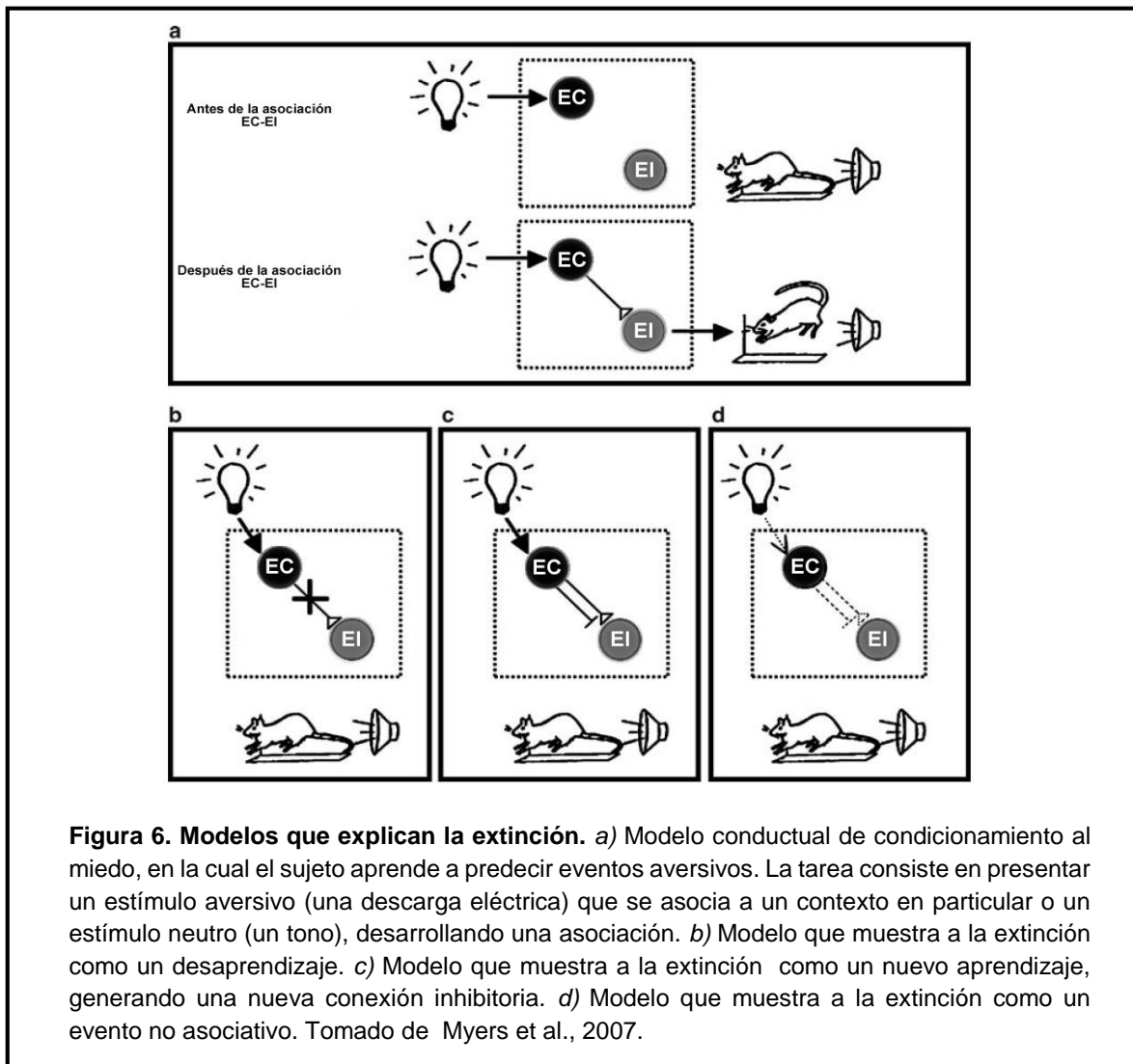
2004; Bermúdez-Rattoni et al., 2005). De manera interesante, diversas proteínas que se encuentran relacionadas con la formación y el mantenimiento del CAS se encuentran también relacionadas con la expresión de la LTP en la CI, lo que sugiere una coincidencia de mecanismos entre estos dos fenómenos (Escobar et al., 1998a; Escobar y Bermudez-Rattoni, 2000; Escobar, Alcocer y Bermúdez-Rattoni, 2002). En este sentido, en un estudio previo de nuestro grupo de trabajo se observó que la inducción de LTP en la CI previo al entrenamiento en el CAS modifica la extinción de esta tarea (Escobar y Bermúdez-Rattoni, 2000).

4. Extinción

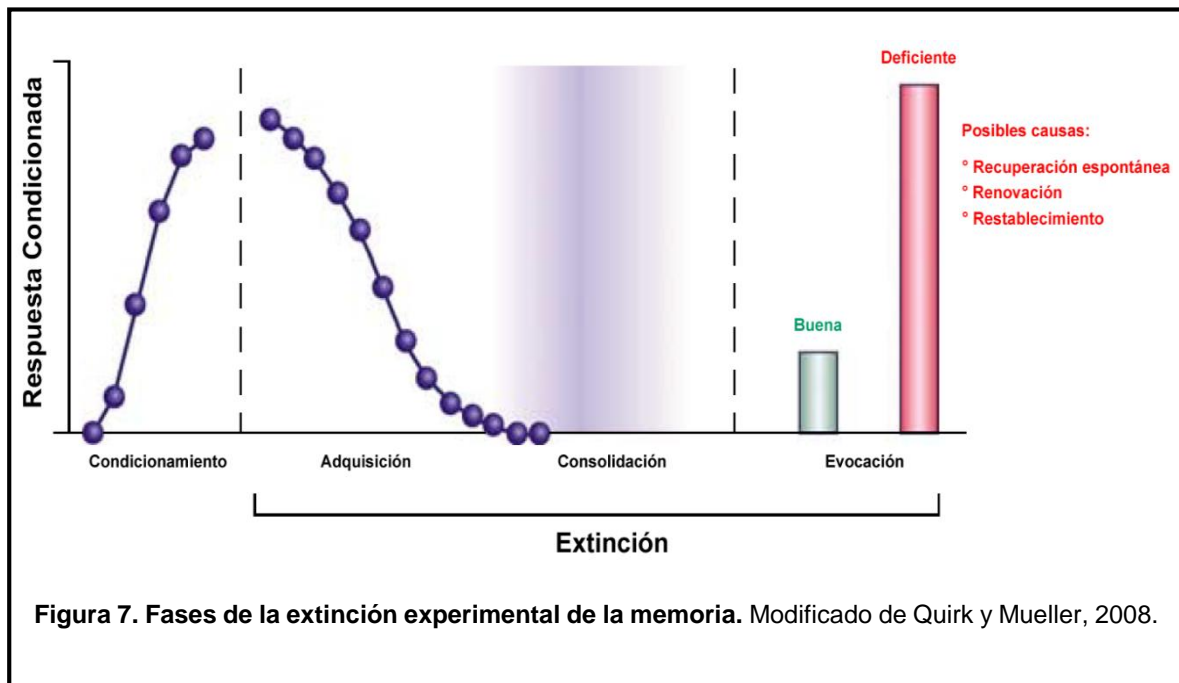
El término extinción fue acuñado por Ivan Pavlov en 1927 tras observar que la respuesta condicionada de salivación disminuía, y finalmente desaparecía, cuando el EC (campana) era repetidamente presentado en ausencia del EI (comida) (Rescorla, 2001). Así, la extinción puede definirse como la reducción o inhibición temporal de la RC que tiene lugar cuando, luego de establecida una asociación EC-EI, se presenta de forma reiterada el EC en ausencia del EI (Herry et al., 2010; Myers y Davis, 2002; Myers, Ressler y Davis, 2007).

Pese a que Pavlov inicialmente consideró la extinción como una inhibición de la RC, existen otras interpretaciones que difieren en sus supuestos, acerca de cómo se forman y modifican las asociaciones entre los estímulos durante la extinción (Myers et al., 2007). Una de estas aproximaciones considera a la extinción como una pérdida de la asociación entre los estímulos, es decir como un desaprendizaje (Rescorla y Wagner, 1972 citado por Bouton, 2004) (Figura 6). Otra considera la extinción como un evento no asociativo, donde gradualmente la asociación entre los estímulos pierde fuerza (Myers et al., 2007) (Figura 6). Sin embargo, la conceptualización de la extinción en términos de desaprendizaje o borrado de la información previamente adquirida, ha evolucionado dando paso al concepto actual de extinción, considerándola como un fenómeno de aprendizaje altamente complejo que no involucra la desaparición del aprendizaje original (Delamater, 2004; Myers et al., 2007; Rescorla, 2001). El modelo de extinción más aceptado hoy en día, considera a este fenómeno como un nuevo aprendizaje

(Maroun et al., 2012) caracterizado por el desarrollo de una nueva asociación entre el EC y el EI, en el que se reconoce que el EI ya no ocurre después de la presencia del EC (Figura 6). Esta nueva asociación es de naturaleza inhibitoria y se caracteriza por su estado lábil ya que con el paso del tiempo puede ser desplazada por el trazo original de memoria (recuperación espontánea) o bien por el cambio de contexto (renovación) (Bouton, Westbrook, Corcoran, y Maren, 2006; Myers y Davis, 2002).

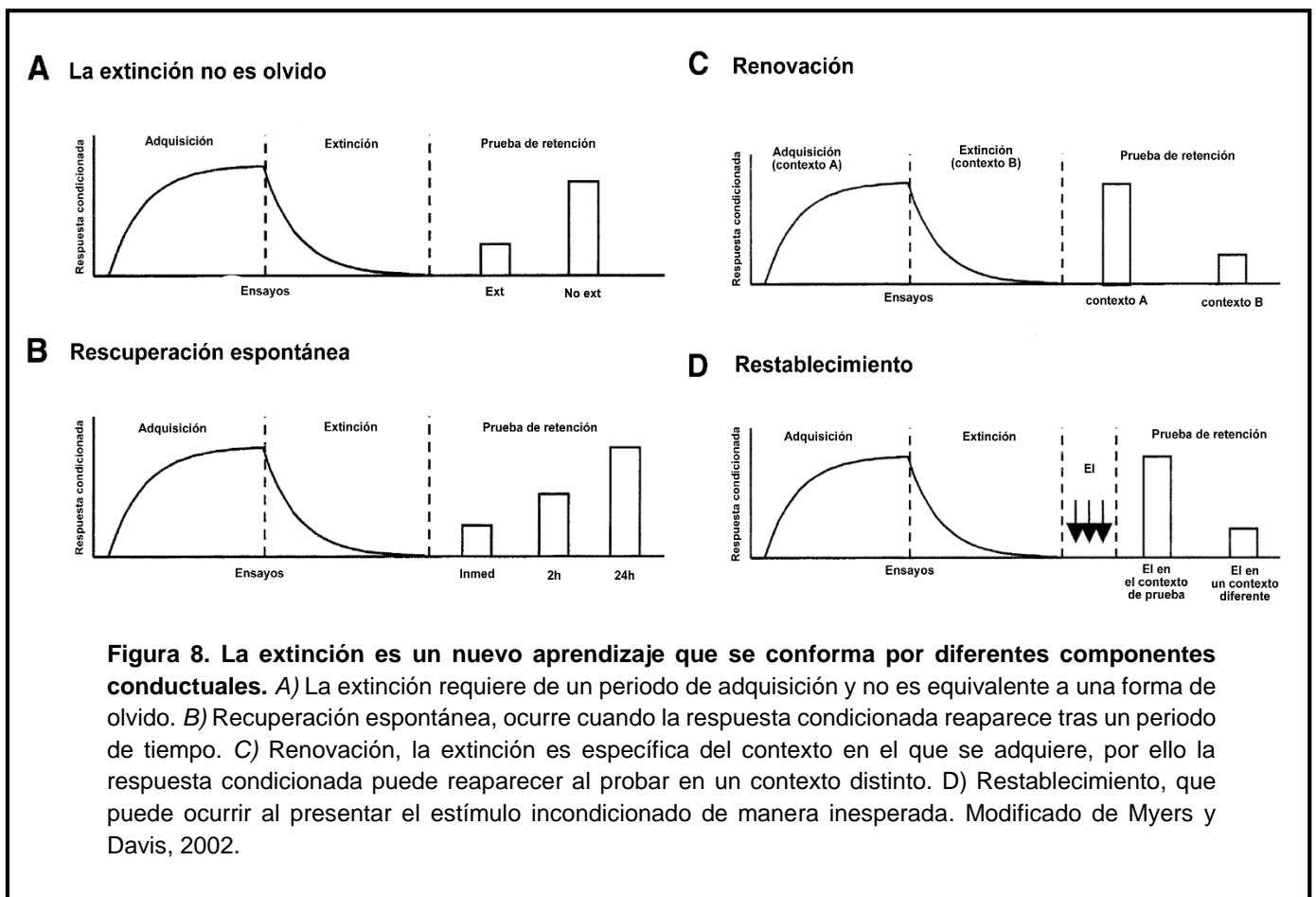


De manera similar al aprendizaje original, durante la extinción se presentan las fases de adquisición, consolidación y evocación (Quirk y Mueller, 2008) (Figura 7).



Por otra parte, se conoce que la extinción de la memoria no es permanente, ya que se observa que, en varias ocasiones, la memoria original reaparece, lo que implica que en realidad continúa codificada en el cerebro después de la extinción, sólo que no se expresa. En este sentido, existen algunos protocolos conductuales que permiten visualizar la presencia de la memoria original (Figura 8a). En primer lugar, luego de un protocolo que genera extinción, ante el simple paso del tiempo y la nueva presentación del EC, puede evidenciarse nuevamente la presencia de la RC, fenómeno denominado *recuperación espontánea* (Figura 8b). En segundo lugar, el fenómeno de *renovación* hace referencia a la reaparición de la RC cuando

los sujetos que recibieron el protocolo de extinción son evaluados en un contexto diferente al utilizado para la sesión de extinción (Figura 8c). Por último, el fenómeno de *restablecimiento* implica la reaparición de la RC luego de la exposición a un EI que por sí solo no induciría la RC (Herry et al., 2010; Myers y Davis, 2002, Myers et al., 2007;) (Figura 8d).



Por otra parte, se han identificado tres condiciones que modulan la extinción: 1) cuanto más fuerte es la respuesta condicionada tras la adquisición, más tiempo tardará en extinguirse; 2) el número de ensayos en los que el estímulo

incondicionado sigue al condicionado influirá en la extinción de la respuesta condicionada; y 3) el tiempo de exposición al estímulo condicionado durante los ensayos de extinción influirá en la curva de su reducción (Klein, 1997). En resumen, la extinción no representa el olvido de una tarea aprendida sino un nuevo aprendizaje que sustituye la respuesta conductual de la primera asociación (Myers y Davis, 2002). Asimismo, la extinción es un proceso activo de aprendizaje distinto al de la adquisición del aprendizaje original, ya que éste requiere de entrenamiento adicional para desarrollarse, así como de un proceso de consolidación, dependiente de síntesis de proteínas para su persistencia (Berman y Dudai, 2001). Por tanto, durante la extinción la respuesta condicionada puede recuperarse, debido a que el trazo original no se ha perdido (Berman, Hazvi, Stehberg, Bahar, y Dudai, 2003).

En cuanto a los mecanismos celulares asociados al proceso de extinción, se reconoce la participación de los receptores NMDA (Fiorenza, Rosa, Izquierdo, y Myskiw, 2012), así como la activación de proteínas cinasas como la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) (Chen et al., 2005; Lin et al., 2001), las cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Lu, Walker, y Davis, 2001), y fosfatasas como la calcineurina (CaN) (Lin et al., 2003a; Lin et al., 2003b; Lin et al., 2003c; Almeida-Corrêa et al., 2015).

En este mismo orden de ideas, en una serie de trabajos publicados por Lin y colaboradores, se encontró que tras un protocolo de extinción se activan eventos moleculares antagónicos a los que ocurren durante la consolidación de la memoria original, como por ejemplo la activación de fosfatasas (particularmente CaN) vs.

cinastas, respectivamente (Lin et al., 2003a; Lin et al., 2003b; Lin et al., 2003c). Asimismo, se ha observado la CaN juega un papel importante en la inducción de LTD en la región CA1 del hipocampo (Mulkey, Endo, Shenolikar y Malenka, 1994), mientras que su inhibición antagoniza la generación de LTP en la corteza visual de la rata (Funauchi, Haruta y Tsumoto, 1994). En relación a esto, nuestros estudios previos han demostrado que la inducción de LTP en la proyección de BLA-CI previo al entrenamiento del CAS incrementa la retención de esta tarea (Escobar y Bermúdez-Rattoni, 2000), mientras que la inducción de LTD, en esa misma región, facilita su extinción (Rodríguez-Durán et al., 2017).

5. LTP y conducta

Existen evidencias sólidas a favor de una relación entre el aprendizaje y la LTP (Nicoll, 2017). Se sabe que el aprendizaje suele estar asociado a cambios funcionales y estructurales en las sinapsis, involucrando la formación o pérdida de éstas, permitiendo la formación de trazos de memoria de larga duración del conocimiento adquirido. Asimismo, se sabe que dichos cambios también se encuentran asociados al establecimiento y mantenimiento de la LTP en diversas regiones cerebrales, estableciendo una relación estrecha entre los dos fenómenos (Fu, Yu, Lu y Zuo, 2012; Hofer, Mrcsic-Flogel, Bonhoeffer y Hübener, 2009; Muñoz-Cuevas, Athilingam, Piscopo y Wilbrecht, 2013; Nabavi et al., 2014; Xu et al, 2009; Yang, Pan y Gan, 2009).

El aprendizaje es un producto de la experiencia diaria, y este producto se ve reflejado en cambios en la actividad de ensambles neuronales que codifican la información obtenida (Bear et al., 2001). Evidencias recientes sugieren que los trazos de memoria se almacenan únicamente en las poblaciones neuronales que presentan mayor excitabilidad, la cual es asociada a las acciones de factores de transcripción, como es el caso de CREB, por ejemplo aquellas neuronas de la amígdala que se activan tras el entrenamiento en una tarea aversiva como el condicionamiento al miedo (Rogerson et al., 2014).

Como se mencionó anteriormente, se conoce que CREB es uno de los actores moleculares que participan en el mantenimiento de la LTP. Investigaciones recientes han demostrado que CREB es necesario para la recuperación de la

información aprendida (Silva, Zhou, Rogerson, Shobe y Balaji, 2009). En 2007 Han y colaboradores reportaron que, en animales entrenados en el condicionamiento de miedo a un tono, las neuronas de la amígdala lateral que fueron reclutadas para almacenar el trazo de información, fueron únicamente aquellas que previo al entrenamiento habían sido transfectadas con un virus que codifica para CREB (Han et al., 2007). Asimismo, al inactivar o remover dichas células en los animales entrenados, se generó una amnesia temporal para el condicionamiento (Han et al., 2009; Zhou et al., 2009). Adicionalmente, estudios electrofisiológicos muestran que tras el entrenamiento en el condicionamiento de miedo al tono, las mismas neuronas de la amígdala lateral, muestran incrementos en la fortaleza sináptica, en comparación con las neuronas no transfectadas (Zhou et al., 2009). Estos trabajos sustentan la idea que postula que la memoria es almacenada en aquellas neuronas que presentan incrementos en la eficiencia sináptica.

En una serie de experimentos llevados a cabo por Rogan et al., en 1997 y McKernan et al., en el mismo año, se encontró 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 y Shinnick-Gallagher, 1997; Rogan, Satubli y Ledoux, 1997) . De igual forma Whitlock y colaboradores descubrieron que el entrenamiento en la tarea de prevención pasiva induce LTP en el área CA1 hipocampal (Whitlock, Heynen, Shuler y Bear, 2006).

En concordancia con lo anterior, la aparición de técnicas como la optogenética, ha permitido explorar la relación entre el aprendizaje y la LTP desde una aproximación más detallada, logrando mapear los múltiples componentes de un ensamble neuronal que forma una huella mnemónica. Las neuronas que forman tal ensamble pueden ser etiquetadas durante el aprendizaje para su posterior identificación y manipulación, y si esas neuronas se eliminan o inactivan, se tiene como resultado una expresión reducida de la memoria almacenada. De manera similar, la sola activación de dichas células mediante la estimulación con un haz de luz es suficiente para recuperar la información aprendida (Liu et al., 2012). En una investigación más reciente, se analizó específicamente la relación entre las expresiones de plasticidad sináptica como la LTP y la LTD (la cual consiste en un decremento prolongado en la eficiencia sináptica tras una estimulación de baja frecuencia) y la memoria; para ello, se entrenó a ratas en el condicionamiento al miedo, pero se reemplazó el EC (tono) con estimulación optogenética en las proyecciones del núcleo auditivo sobre las neuronas de la amígdala lateral. La asociación entre el EC óptico con un choque eléctrico en las patas (EI) generó una respuesta condicionada, la cual fue susceptible de ser extinguida y bloqueada por la inhibición del receptor NMDA, lo que implica la generación de una memoria asociativa. Tal manipulación fue capaz de generar LTP en las neuronas de la amígdala, y al ser ésta revertida con la generación de LTD en las mismas células se logró inactivar el trazo de memoria creado (Nabavi et al., 2014).

Por otra parte, en 1998 Rioult-Pedotti et al. demostraron que el aprendizaje de 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, Friedman, Hess y Donogue, 1998).

Aunado a lo anterior, 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 9), comparado con el hemisferio contralateral, utilizado como control (Rioult-Pedotti et al., 2000).

Las investigaciones descritas anteriormente indican 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 subsecuentemente 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 y Bear, 1996), el cual es considerado como un mecanismo de plasticidad homeostática que será descrito a continuación.

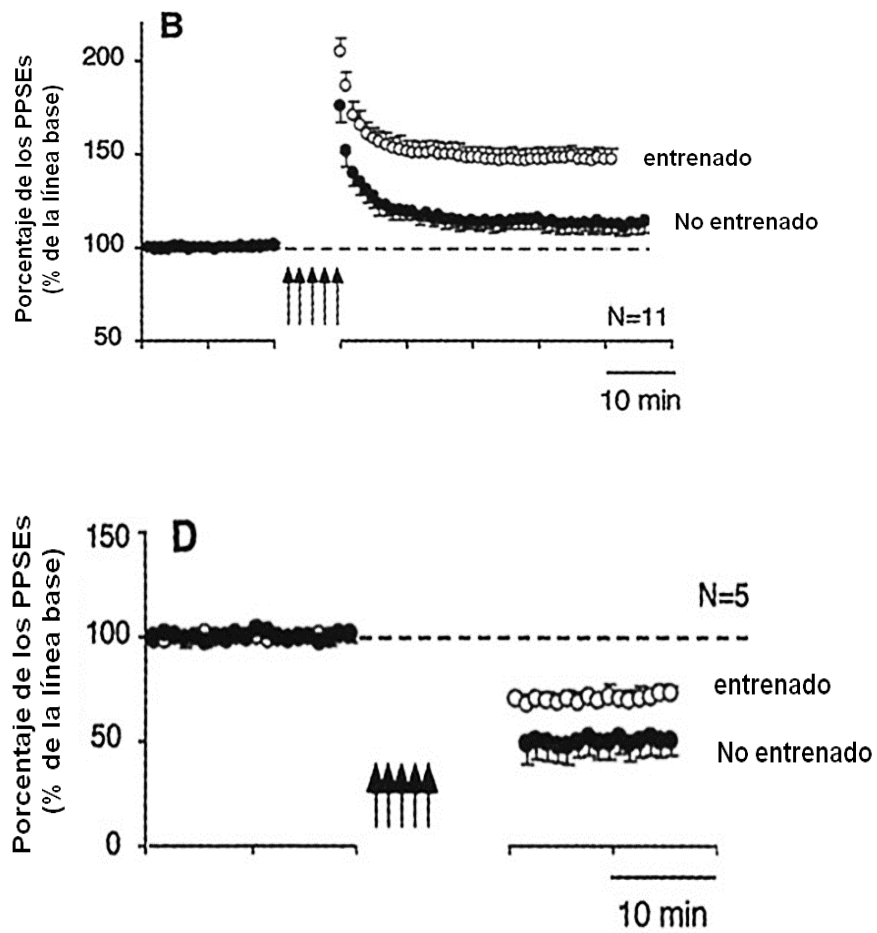


Figura 9 .El entrenamiento en habilidades motoras modifica la inducción subsecuente de plasticidad sináptica en la corteza motora. El entrenamiento en tareas motoras disminuye la magnitud de la LTP e incrementa la de la LTD. Círculos negros: hemisferio entrenado. Círculos blancos: hemisferio no entrenado (Modificado de Rioult–Pedotti et al., 2000).

6. Plasticidad homeostática

Conforme el sistema nervioso se va desarrollando, numerosas experiencias van modificando sus conexiones a lo largo de la vida, y por ello es congruente pensar que estas modificaciones plásticas necesiten de un mecanismo regulador que les permita mantenerse en un estado homeostático para poder seguir almacenando información (Nelson y Turrigiano, 2008). En este contexto, investigaciones recientes han reportado que 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 modificaciones abruptas que pueden causar daño o muerte neuronal; por tanto, a este tipo de cambios en las propiedades nerviosas se les ha dado el nombre de plasticidad homeostática (Nelson y Turrigiano, 2008). Este tipo de modificaciones se presenta de distintas formas dependiendo del tipo de plasticidad sináptica inducida y la vía que sea sujeto de estudio. Dos de los mecanismos principales de la plasticidad homeostática son la metaplasticidad y el escalamiento sináptico.

6.1. Metaplasticidad y escalamiento sináptico

Hoy en día existen evidencias que muestran que la historia de actividad de una neurona o vía de conexión puede modificar la manera en que ésta presentará subsecuente plasticidad sináptica (Abraham, 2008). En este sentido, se han observado cambios subsecuentes al inducir LTP en una misma vía; estos cambios

incluyen una inhibición de la LTP y una facilitación de la depresión de largo plazo (LTD) (Huang, Colino, Selig y Malenka, 1992; Malenka, 1991). A este fenómeno se le conoce como metaplasticidad y se define como el cambio en la habilidad para inducir subsecuente plasticidad sináptica. Este tipo de modificaciones se presentan incluso cuando la actividad previa no es suficiente para producir modificaciones observables en la eficiencia sináptica (Figura 10a).

En 1982 Bienestock, Cooper y Munro propusieron la existencia de un umbral de activación postsináptica, lo cual implica que la vía es potenciada cuando la activación de la postsinapsis excede un valor crítico, llamado umbral de modificación o θ_m , mientras que una vía es depotenciada cuando la activación postsináptica es mayor que cero pero menor que el valor θ_m (Figura 10b), a esta teoría también se le denominó BCM (por las iniciales de los autores). Es importante señalar que este umbral no es fijo (Bienestock, Cooper y Munro, 1982), y que la frecuencia de estimulación es directamente proporcional a la activación de la postsinapsis, esto es, que a frecuencias más altas se da una mayor activación de la postsinapsis, mientras que a frecuencias más bajas la activación es menor, por lo cual el nivel de potenciación o depotenciación depende de la frecuencia de estimulación (Bear, 1996). Esta relación se explica por la cantidad de calcio que ingresa a la neurona, ya que depende de la frecuencia con la cual se le estimula (Bear, 2003; Jedlicka, 2002). En este sentido, se ha reportado que cuando se aplica estimulación que induce LTP, pero se inhibe parcialmente la entrada de calcio a la célula, se presenta LTD en lugar de LTP (Taniike, Lu, Tomizawa y Matsui, 2008).

La modificación del umbral es temporal y es considerado como un mecanismo homeostático que protege a las neuronas, por ejemplo, de estímulos de gran intensidad o de frecuencias que pudieran provocar excitotoxicidad (Bear, 2003). Durante las tres décadas posteriores al origen de la teoría BCM, numerosas investigaciones se han dirigido a dilucidar algunas propiedades fundamentales de la plasticidad sináptica y han generado una comprensión más clara de la relación entre la estructura matemática de la teoría y los mecanismos moleculares que subyacen al aprendizaje y la memoria (Cooper y Bear, 2012).

El hecho de que existan cambios metaplásticos durante tareas de aprendizaje nos sugiere que estos cambios no solo tienen un papel neuroprotector, sino modulador del almacenamiento de información.

Recientemente, se han comenzado a estudiar los mecanismos moleculares relacionados con estos tipos de plasticidad y se ha encontrado que existen varios mecanismos encargados de comandar una regulación en las células excitadas. Por un lado, la modulación de la actividad de proteínas cinasas y fosfatasas puede modificar el umbral para la inducción de plasticidad sináptica. Por ejemplo, la entrada de calcio provoca la autofosforilación de la CaMKII, lo cual, limita la actividad de dicha proteína, evitando que realice acciones que se encuentran relacionadas con la inducción de la LTP (Bear, 2003; Jedlicka, 2002; Zhang et al. 2005). Por otro lado, la CaN, una proteína fosfatasa relacionada con la inducción de la LTD, es activada durante la metaplasticidad, promoviendo cambios que favorecen

a la inducción de la LTD y desfavorecen la inducción de la LTP, entre los que se encuentra la regulación negativa de la PKA (Mansuy, 2003).

Se han reportado investigaciones en donde la privación de estímulos visuales incrementa la probabilidad de inducir LTP en la corteza visual primaria que está acompañada de un aumento en la expresión de las subunidades GluN2B de los receptores NMDA, mientras que la estimulación visual aumenta la capacidad de inducir LTD por medio de la expresión de las subunidades GluN2A en esta vía (Yashiro y Philpot, 2008) (Figura 10c). Esto puede deberse a que la subunidad GluN2A tiene una cinética más rápida, es decir, en períodos de tiempo iguales, los canales NMDA que contienen la subunidad GluN2A se abren y se cierran un mayor número de veces que cuando estos canales contienen la subunidad GluN2B (Erreger, Dravid, Banke, Wyllie, Traynelis, 2005). Este efecto produce que los receptores NMDA que contengan subunidades GluN2A, 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 GluN2B tendrán una mayor resolución ante estímulos de baja frecuencia, como los que inducen LTD (Pérez-Otaño y Ehlers, 2005; Quinlan et al., 2004).

La modificación en el umbral θ_m también se ha atribuido 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 (Abraham, 2008; Cohen, Coussens, Raymond y Abraham, 1999). 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 θ_m hacia la izquierda, lo cual se ve reflejado como una facilitación en la inducción de LTP. Además, se ha reportado que la activación de receptores mGluR puede reducir la hiperpolarización de la membrana después del potencial de acción, modificando la posibilidad de inducir LTP (Cohen et al., 1999).

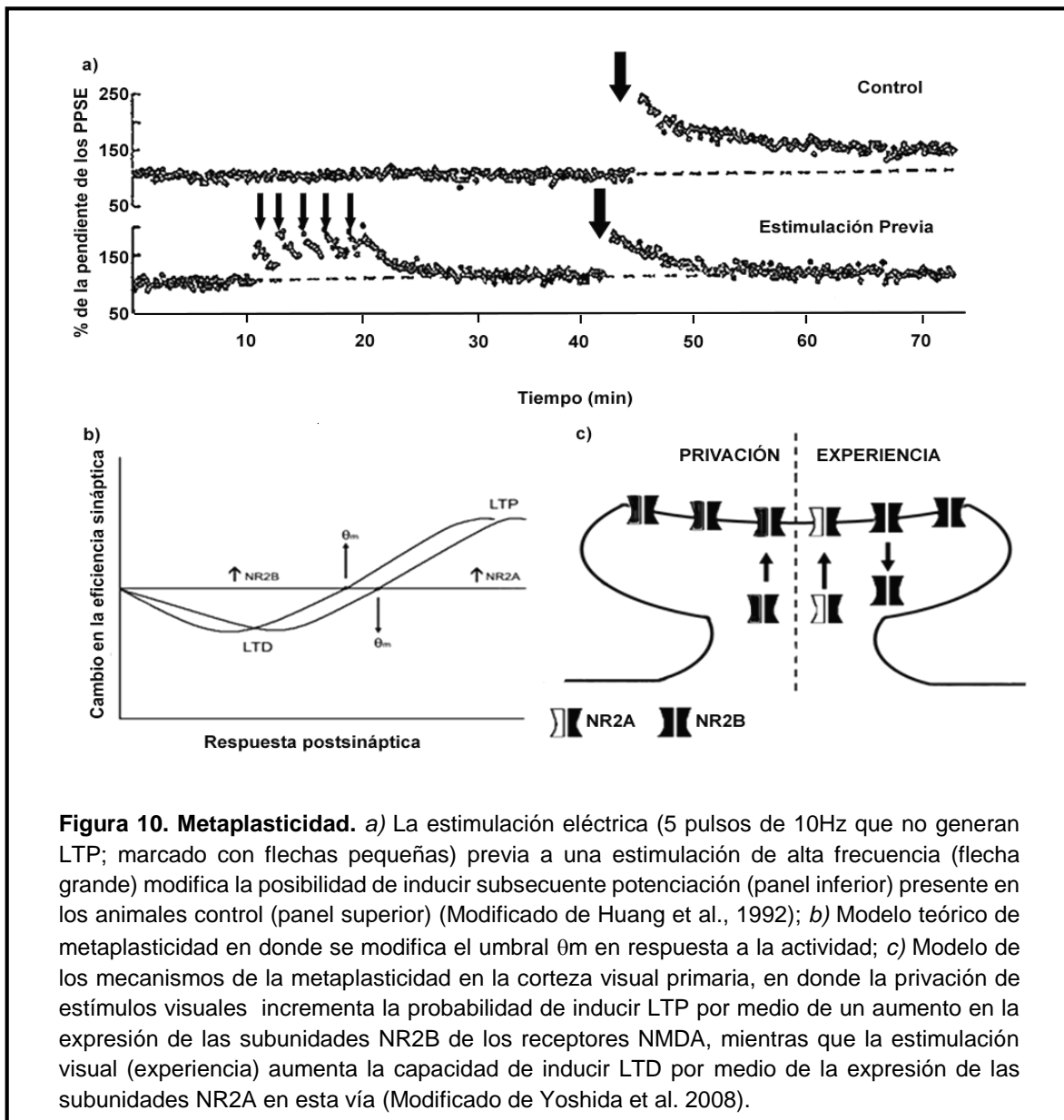
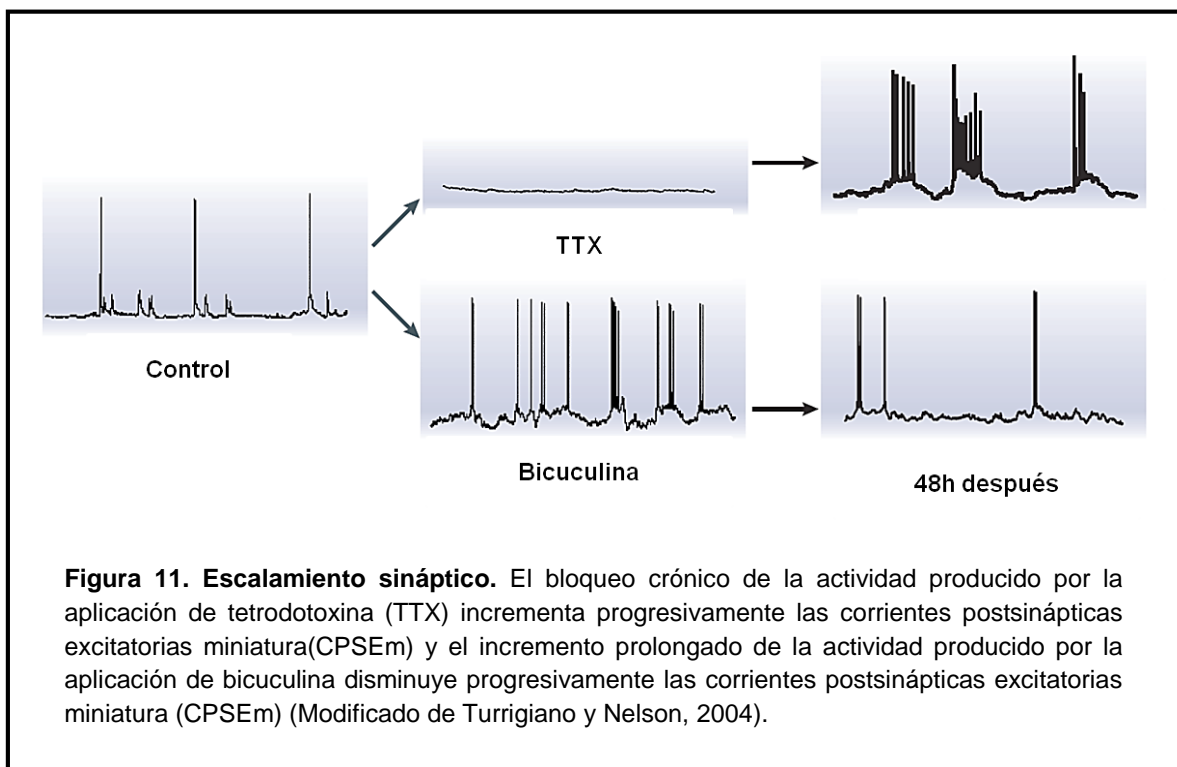


Figura 10. Metaplasticidad. a) La estimulación eléctrica (5 pulsos de 10Hz que no generan LTP; marcado con flechas pequeñas) previa a una estimulación de alta frecuencia (flecha grande) modifica la posibilidad de inducir subsecuente potenciación (panel inferior) presente en los animales control (panel superior) (Modificado de Huang et al., 1992); b) Modelo teórico de metaplasticidad en donde se modifica el umbral θ_m en respuesta a la actividad; c) Modelo de los mecanismos de la metaplasticidad en la corteza visual primaria, en donde la privación de estímulos visuales incrementa la probabilidad de inducir LTP por medio de un aumento en la expresión de las subunidades NR2B de los receptores NMDA, mientras que la estimulación visual (experiencia) aumenta la capacidad de inducir LTD por medio de la expresión de las subunidades NR2A en esta vía (Modificado de Yoshida et al. 2008).

Otro mecanismo desarrollado por el sistema nervioso para preservar su homeostasis es el escalamiento sináptico, el cual mantiene en un nivel estable la excitabilidad neuronal mediante un incremento progresivo de la eficiencia sináptica, como respuesta a la inhibición prolongada de actividad y un decremento progresivo de la eficiencia sináptica como respuesta a la excitación neuronal crónica.

En 1998, Turrigiano y colaboradores reportaron que el bloqueo durante 48 h de los receptores para GABA producía una disminución de las corrientes postsinápticas excitatorias miniatura (CPSEm), compensando el aumento de actividad. De manera similar, cuando se presenta una inhibición crónica de los canales de sodio con tetrodotoxina, se genera un incremento de las CPSEm, compensando la disminución de actividad (Figura 11) (Turrigiano, Leslie, Desai, Rutherford y Nelson, 1998; Turrigiano y Nelson, 2004).



El escalamiento sináptico se ha observado en cultivos neocorticales, hipocampales, de médula espinal y en el núcleo accumbens, así como en preparaciones in vivo (Abbott y Nelson, 2000) y muestra que las células del sistema

nervioso tienen la capacidad de integrar los estímulos recibidos para ajustar la eficiencia sináptica mediante la modulación del paso de corriente a través de los canales iónicos (Turrigiano y Nelson, 2000).

6.2. Metaplasticidad y conducta

La plasticidad homeostática es actualmente considerada como un fenómeno que tiene especial importancia para la modulación de la actividad en el sistema nervioso. 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 SNC 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 SNC, como en la amígdala lateral debido al condicionamiento al miedo (Schroeder y Shinnick-Gallagher, 2005; Hong et al., 2011). Ejemplos de áreas neocorticales donde se han inducido cambios metaplásticos debido al entrenamiento en tareas conductuales son la corteza motora debido al entrenamiento en tareas motoras (Riout-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, Cho y Bear, 2007) la corteza somatosensorial debido a la estimulación de las vibrisas

(Clem, Celikel y Barth, 2008) e, incluso, se han reportado cambios metaplásticos in vivo en la corteza motora en respuesta al entrenamiento en habilidades motrices (Monfils y 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.

En humanos se han realizado investigaciones que relacionan al aprendizaje con los cambios en la excitabilidad de las neuronas. En una tarea de aprendizaje se entrenó a un grupo de sujetos a incrementar la velocidad en el movimiento de su dedo pulgar, este aprendizaje está asociado con un cambio rápido en la excitabilidad de la corteza motora primaria y es inhibido por la previa estimulación magnética transcraneal en esta zona de la corteza, similar a lo encontrado por Rioult-Pedotti en el 2000 (Muellbacher, Ziemann, Boroojerdi, Cohen, Hallet, 2001).

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 desempeño durante el entrenamiento en tareas conductuales (Moser, Krobot, Moser y Morris, 1998; Escobar y 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 (Escobar y Bermudez-Rattoni, 2000). Aunado a lo anterior, nuestras investigaciones recientes muestran que el entrenamiento en el CAS bloquea la posibilidad de inducir subsecuente LTP en la vía BLA-CI, generada por estimulación de alta frecuencia (Rodríguez-Durán et al., 2011) o por la microinfusión de BDNF en la CI (Rivera-Olvera et al., 2016), y que dicho fenómeno es dependiente de los receptores NMDA y de la actividad diferencial de proteínas cinasas como PKA y PKC (Rodríguez-Durán y Escobar, 2014) (Figura 12). Hoy en día se cree que el fenómeno de metaplasticidad no sólo tiene como función el mantenimiento de la homeostasis de las sinapsis, sino podría también funcionar como un modulador de la información, al preservar por largo tiempo un trazo de memoria.

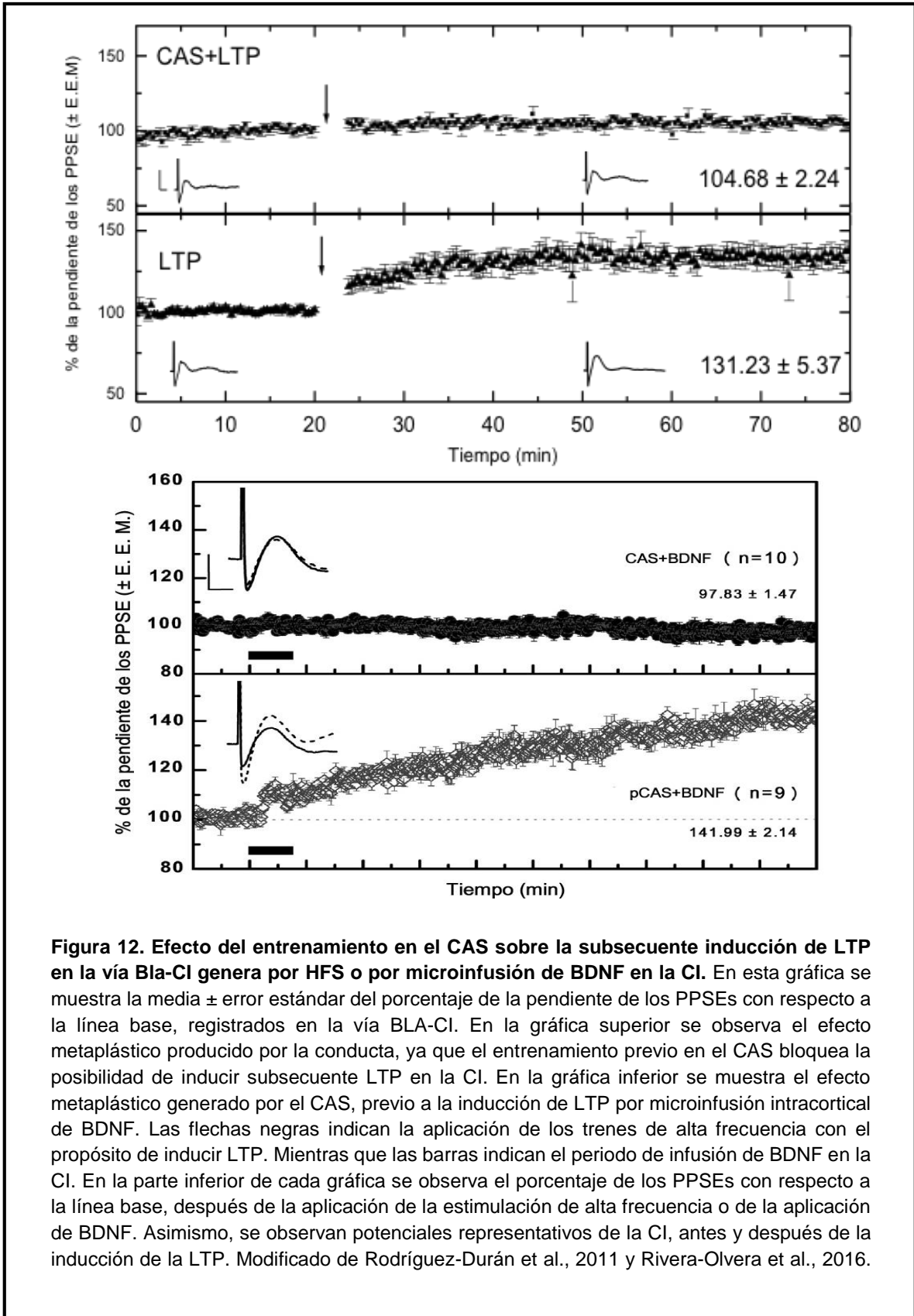


Figura 12. Efecto del entrenamiento en el CAS sobre la subsecuente inducción de LTP en la vía Bla-CI genera por HFS o por microinfusión de BDNF en la CI. En esta gráfica se muestra la media \pm error estándar del porcentaje de la pendiente de los PPSEs con respecto a la línea base, registrados en la vía BLA-CI. En la gráfica superior se observa el efecto metaplástico producido por la conducta, ya que el entrenamiento previo en el CAS bloquea la posibilidad de inducir subsecuente LTP en la CI. En la gráfica inferior se muestra el efecto metaplástico generado por el CAS, previo a la inducción de LTP por microinfusión intracortical de BDNF. Las flechas negras indican la aplicación de los trenes de alta frecuencia con el propósito de inducir LTP. Mientras que las barras indican el periodo de infusión de BDNF en la CI. En la parte inferior de cada gráfica se observa el porcentaje de los PPSEs con respecto a la línea base, después de la aplicación de la estimulación de alta frecuencia o de la aplicación de BDNF. Asimismo, se observan potenciales representativos de la CI, antes y después de la inducción de la LTP. Modificado de Rodríguez-Durán et al., 2011 y Rivera-Olvera et al., 2016.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Estudiar los procesos de aprendizaje y memoria desde la perspectiva de los mecanismos celulares y moleculares que los sustentan, nos acerca a entender de forma más clara el comportamiento y procesamiento de información en los seres vivos.

Se conoce claramente que las proyecciones del núcleo basolateral amigdalino hacia la corteza insular participan en el procesamiento del condicionamiento de aversión a los sabores (Bermúdez-Rattoni, 2004), y que éstas mismas son capaces de presentar potenciación de largo plazo dependiente de los receptores NMDA debido a estimulación de alta frecuencia (Escobar et al., 1998a; Escobar et al., 2002; Escobar, Chao y Bermúdez-Rattoni, 1998b). Asimismo, estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que el entrenamiento en el CAS, antecediendo a la estimulación tetánica o a la microinfusión de BDNF en la misma vía, bloquea la posibilidad de inducir subsecuente LTP (Rodríguez-Durán et al., 2011; Rodríguez-Durán y Escobar, 2014; Rivera-Olvera et al., 2016). Además, nuestros hallazgos recientes muestran que la inducción de LTD en la proyección BLA-CI previa al entrenamiento en el CAS facilita la extinción de esta tarea. Sin embargo, la inducción de LTP mejora su retención, sugiriendo una modulación bidireccional de la extinción del CAS en respuesta a la LTP o LTD de la proyección BLA-CI (Rodríguez-Durán et al., 2017).

Aunado a lo anterior, el estudio de los eventos celulares y moleculares que subyacen a la formación de la memoria de extinción y su consolidación es aún

incipiente. Así, mientras algunos trabajos muestran coincidencias entre los eventos celulares asociados a la adquisición y consolidación de la memoria original (Lu et al., 2001; Santini, Sepulveda-Orengo y Porter, 2012), otros muestran la ocurrencia de eventos diferenciales como la depotenciación sináptica y la activación de fosfatasa (Lin et al., 2003a; Lin et al., 2003b; Lin et al., 2003c).

Por lo tanto, considerando los antecedentes expuestos, el presente estudio tuvo como finalidad explorar el efecto de la extinción del CAS en la posterior inducción de LTP en la vía de comunicación BLA-CI mediante la estimulación de alta frecuencia, así como evaluar la participación potencial de la proteína fosfatasa CaN en este proceso.

V. OBJETIVOS

1. Analizar la influencia de la extinción del CAS sobre la subsecuente inducción de LTP en la vía BLA-CI generada por estimulación de alta frecuencia.
2. Examinar la influencia del proceso de extinción del CAS sobre la excitabilidad neuronal basal de la vía BLA-CI.
3. Evaluar la expresión de las proteínas CaN y p-Akt en la CI de animales entrenados en el CAS y en la extinción de esta tarea.

VI. METODOLOGÍA

Animales

Para la presente investigación se utilizaron 73 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, iniciándose a las 8 h, a una temperatura promedio de 27 °C, con comida y agua ad libitum (excepto en las fases experimentales que especifiquen lo contrario).

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 contruidos con probetas graduadas cubiertas con tapones de caucho horadados con boquillas de metal. El día de la adquisición del CAS los animales fueron privados de alimento y se substituyó 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, durante dos días adicionales, 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.

Cabe destacar que para los animales sometidos al proceso de extinción la prueba de aversión fue considerada como la primera sesión de éste. Durante la fase de extinción, los animales tuvieron acceso al consumo de la solución sacarina a lo largo de nueve ensayos de extinción (uno cada dos días a lo largo de dieciocho días).

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 y Watson, 2007). Las respuestas

fueron evocadas unilateralmente a través de estimulación directa en el núcleo basolateral amigdalino, en las coordenadas: AP -2.8mm , ML -5.0mm , $-8.5\text{mm} \pm 0.2$ (Paxinos y Watson, 2007), con un electrodo bipolar trenzado de acero de 127 micrómetros de diámetro. La estimulación (pulsos monofásicos de $50\text{-}70 \mu\text{A}$ y 0.25 ms de duración) fue suministrada por un estimulador Grass S48 y aplicada al electrodo de estimulación a través de una unidad PSI U6. 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 dos horas más, con el fin de observar los cambios en la pendiente de los PPSEs.

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 ($1\text{x-}10\text{x}$). La intensidad basal fue determinada como la estimulación necesaria para evocar una respuesta de 10 mV .

Histoquímica de Nissl

Con el fin de verificar la posición exacta de los electrodos en el cerebro de la rata, se utilizó la técnica histológica 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 µm 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.

Ensayo de Western Blot

Con el fin de analizar la expresión del estado fosforilado de la proteína Akt, un blanco directo de la vía de señalización PI-3K, así como la expresión de la proteína fosfatasa CaN posterior a la adquisición y extinción del CAS. Seis ratas de cada condición (CAS, EXT e INT: intacto) se sacrificaron mediante decapitación, obteniendo la corteza insular bilateral de cada animal. Para reducir la variabilidad individual, todas las muestras correspondientes a un mismo grupo fueron

mezcladas en un homogenado. El tejido se homogenizó en solución amortiguadora de lisis (Tris-HCl 20 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, Na₂EDTA 1mM, EGTA 1mM, Triton al 1%, NaPPi 2.5 mM, β -glycerofosfato 1mM, Na₃VO₄ 1 mM, leupeptina 1 μ g/ml) suplementada con una tableta de coctel inhibidor de proteasas (Mini Complete, Roche, Manheim, Alemania). Las muestras se incubaron en hielo durante 10 minutos y se centrifugaron a 8000g por 30 minutos a 4 °C y se obtuvo el sobrenadante. La concentración de proteína en las muestras obtenidas se determinó mediante el método de Bradford (Bio-Rad, California, EE. UU.), utilizando albúmina de suero bovino como proteína estándar.

Posteriormente, las muestras de proteínas se separaron mediante electroforesis vertical en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Se cargaron 50 μ g de proteína en geles de acrilamida a una concentración de 10% y una vez concluida la electroforesis, las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad, California, EE. UU.). Posteriormente, las membranas se bloquearon con leche en polvo baja en grasas al 5% (Bio-Rad, California, EE. UU.), preparada con TBS 1X (Tris pH 7.6, NaCl y Tween 20 [0.1 %]) y se incubaron con los anticuerpos primarios contra calcineurina (1:5000, #610259, BD Biosciences, Nueva Jersey, EE. UU.) y contra fosfo-Akt (1:2000, #9272 Cell Signaling Technology, Massachusetts, EE. UU.) durante toda la noche a 4 °C. Posterior a la incubación, se hicieron 3 lavados de 10 min con TBS-Tween. A continuación, las membranas se incubaron con anti-IgG de ratón (1:4000, #7076 Cell Signaling Technology, Massachusetts, EE. UU.) o anti-IgG de conejo (1:5000, #7074 Cell Signaling Technology, Massachusetts, EE. UU.) acoplados a peroxidasa de rábano

y diluidos también en solución de bloqueo. Al terminar la incubación, las membranas se sometieron a 3 lavados de 10 min con TBS-Tween y 1 lavado de 10 min con TBS. Las bandas inmunorreactivas se detectaron mediante el kit de quimioluminiscencia Amersham TM ECL TM Advance Western Blotting Detection (GE Life Sciences, RPN2232, Illinois, EE. UU.)

De igual forma, se llevó a cabo la detección de las proteínas β -actina (para CaN) y Akt total (para fosfo-Akt), utilizadas como control de carga. Para ello, se lavaron las membranas mediante la técnica de *stripping*, utilizando NaOH 0.2 M durante 15 min. Al concluir, las membranas se bloquearon de nuevo con leche al 5% y se incubaron con anti- β -actina acoplado a peroxidasa de rábano (1:20000, #13E5, Cell Signaling Technology, Massachusetts, EE. UU.), o con anti-Akt (1:2000, #9272 Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA. El anticuerpo secundario utilizado fue: anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa de rábano (1:5000, #7074 Cell Signaling Technology, Massachusetts, EE. UU.).

La intensidad de las bandas se cuantificó mediante un análisis de densitometría con el software Image J 1.49 (NIH, Bethesda, Maryland, EE. UU.). La expresión de la proteína deseada se calculó como el porcentaje respecto al control de carga.

Análisis de datos

El análisis de los datos generados durante los experimentos conductuales se efectuó mediante un ANOVA de dos vías (factores: condición y sesión), y de una vía para los datos obtenidos por el ensayo de Western blot (factor: sesión). En tanto, el análisis correspondiente a los experimentos electrofisiológicos fue el ANOVA para medidas repetidas. Para todos ellos se empleó la prueba post-hoc de Fisher para determinar diferencias significativas con una $p \leq 0.01$. Los estadísticos descriptivos se muestran como la media \pm el error estándar (EEM).

Diseño experimental

Con el fin de evaluar el efecto de la extinción del CAS sobre la posterior inducción de LTP en la vía BLA-CI, así como la influencia de dicha tarea conductual sobre la excitabilidad neuronal en la misma vía, los animales fueron distribuidos en los siguientes grupos experimentales (Figura 13):

- **HFS (n=10):** Conformado por animales que recibieron estimulación de alta frecuencia capaz de inducir LTP en la proyección BLA-CI.
- **CAS+HFS (n=10):** Animales que fueron entrenados en el CAS y 48 h después de la prueba de aversión recibieron HFS capaz de inducir LTP en la CI.

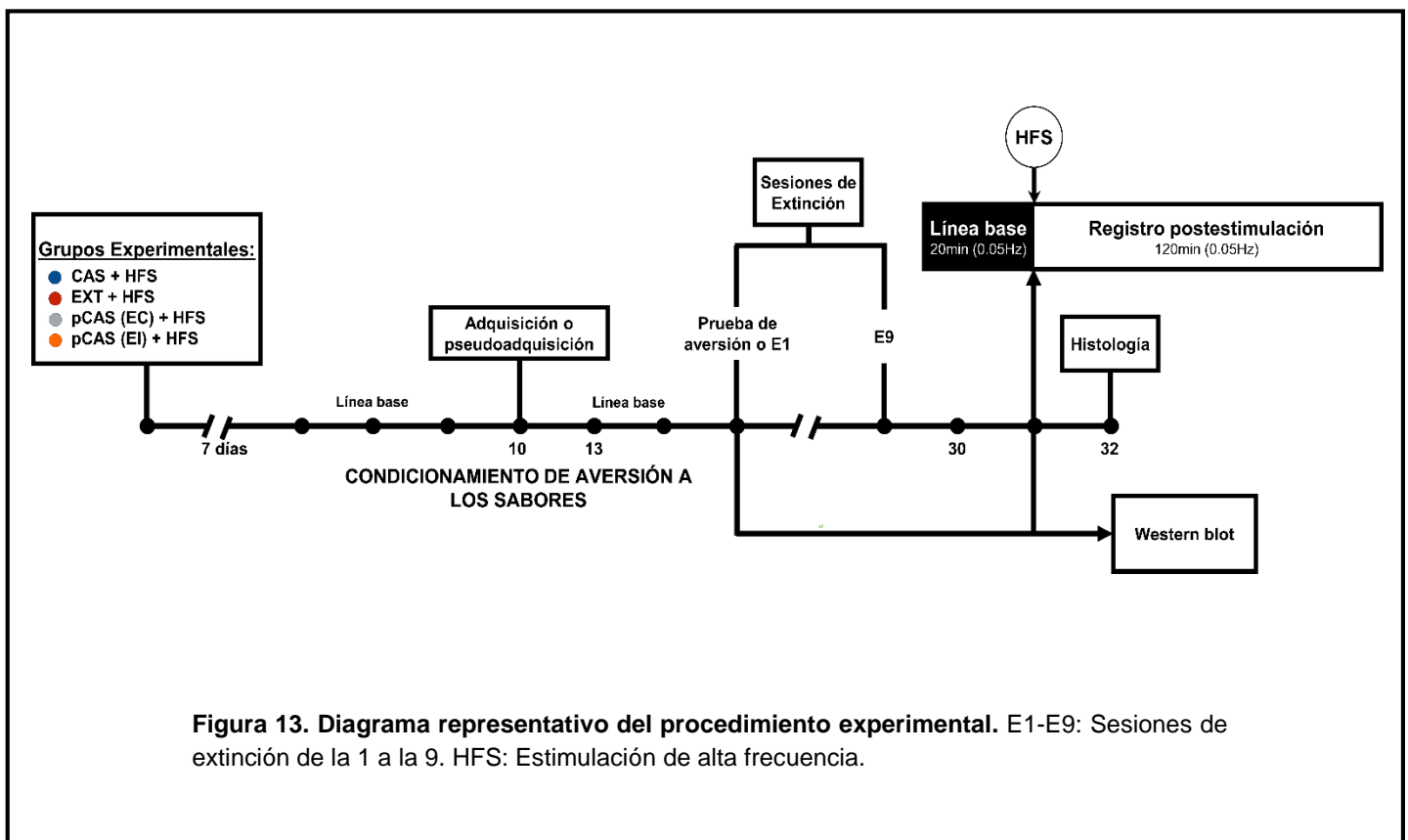
- **EXT+HFS (n=15):** Integrado por animales entrenados en el CAS, incluyendo la fase de extinción y 48 h después del último ensayo de extinción recibieron HFS en la vía BLA-CI con el fin de inducir LTP.
- **pCAS(EC)+HFS (n=10):** Animales que fueron pseudoentrenados en el CAS y 48 h después de la prueba de aversión recibieron HFS para inducir LTP en la CI. Este grupo recibió LiCl en ausencia del estímulo condicionado (solución sacarina) durante la sesión de adquisición del CAS.
- **pCAS(EI)+HFS (n=10):** Animales pseudoentrenados en el CAS que recibieron 48 h después de la prueba de aversión HFS para inducir LTP en la CI. En este grupo el LiCl fue reemplazado por solución salina amortiguada por fosfatos (PBS por sus siglas en inglés) durante la sesión de adquisición.

Para todos los grupos, las respuestas evocadas se registraron durante 2 h posteriores a la HFS. Las curvas I/O fueron registradas en cada animal, previo a la inducción de LTP en la CI.

Por otra parte, con el fin de analizar la expresión de la proteína fosfatasa CaN así como los niveles de expresión del estado fosforilado de la proteína Akt en la CI, se utilizaron 18 animales adicionales para realizar ensayos de Western blot. Para esta fase experimental los animales fueron divididos en los siguientes grupos:

- **CAS (n=6):** En el que los animales fueron entrenados en el CAS y sacrificados 48 h después de la prueba de aversión, para la obtención de la CI bilateral.

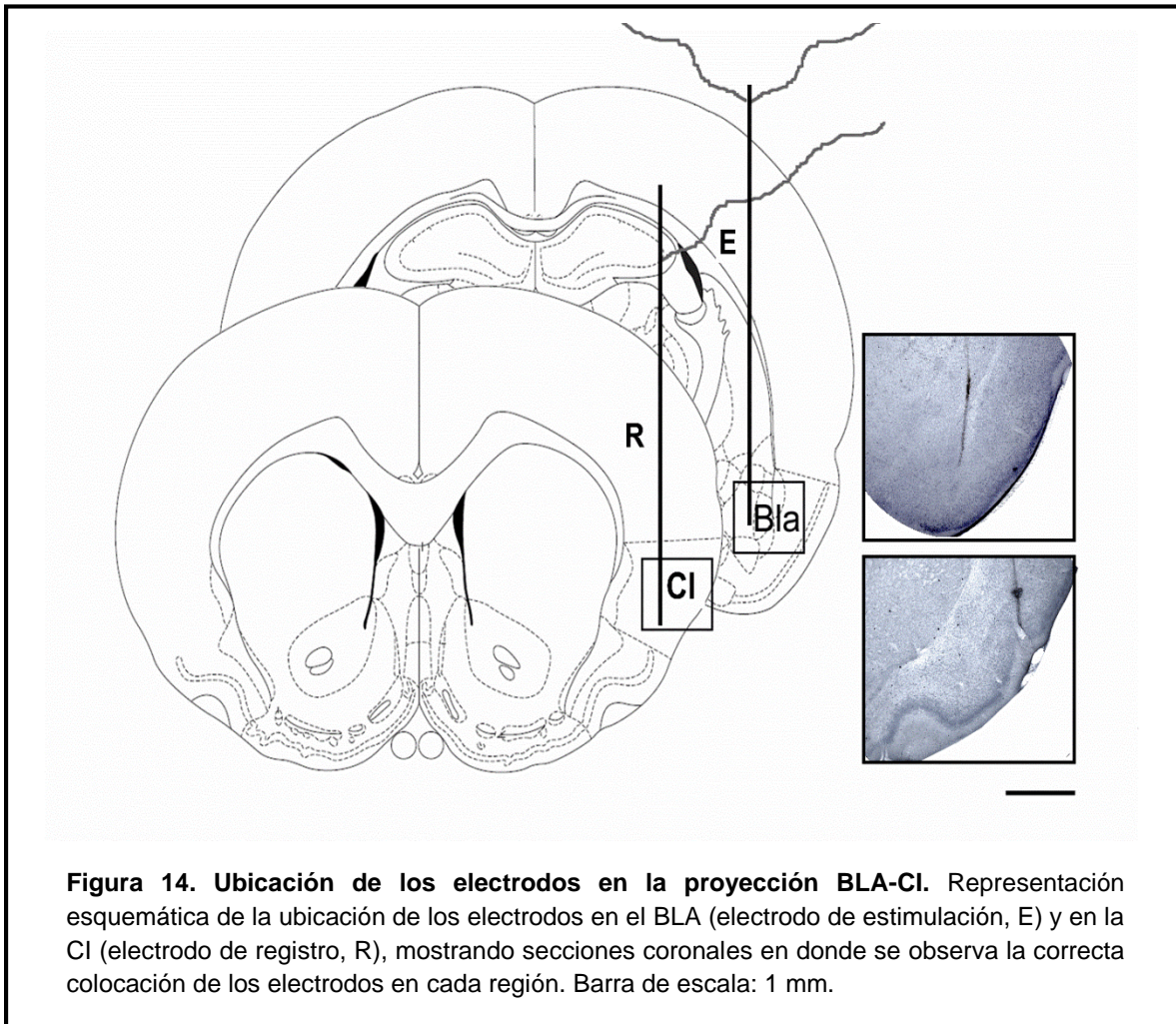
- **EXT (n=6):** Integrado por animales entrenados en el CAS, incluyendo la fase de extinción, sacrificados 48 h después del último ensayo de extinción para la obtención de las muestras de CI.
- **INT (n = 6):** Conformado por animales intactos, es decir, sin haber recibido algún entrenamiento previo, a los que se les extrajo la CI bilateral.



VII. RESULTADOS

a) Resultados histológicos

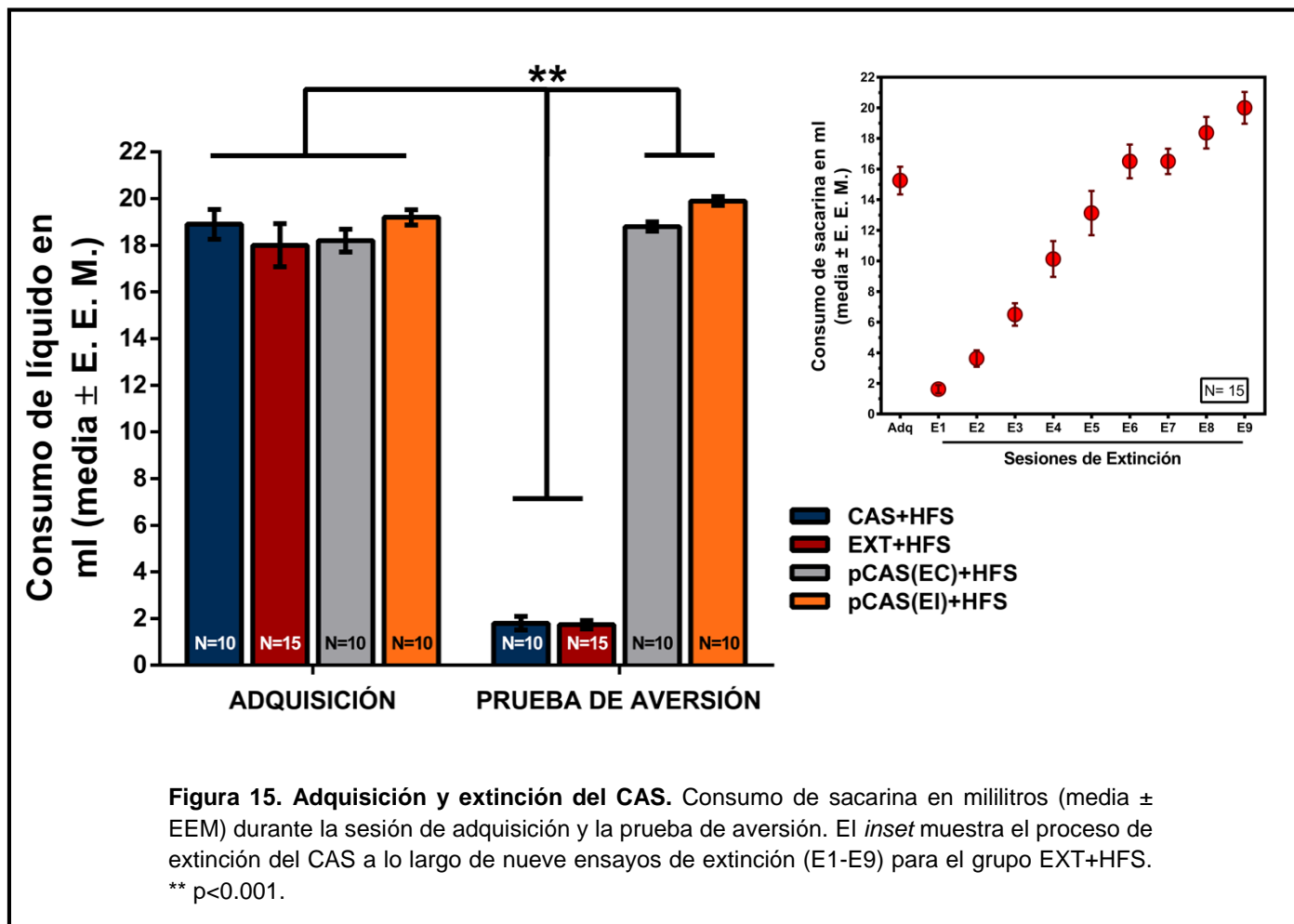
El análisis histológico mostró que, en todas las ratas que fueron sometidas al registro electrofisiológico, los electrodos de estimulación y de registro estuvieron correctamente colocados en el BLA y en la CI respectivamente (Figura 14). Aquellos animales en los que los electrodos no mostraron una adecuada ubicación, fueron excluidos del análisis estadístico.



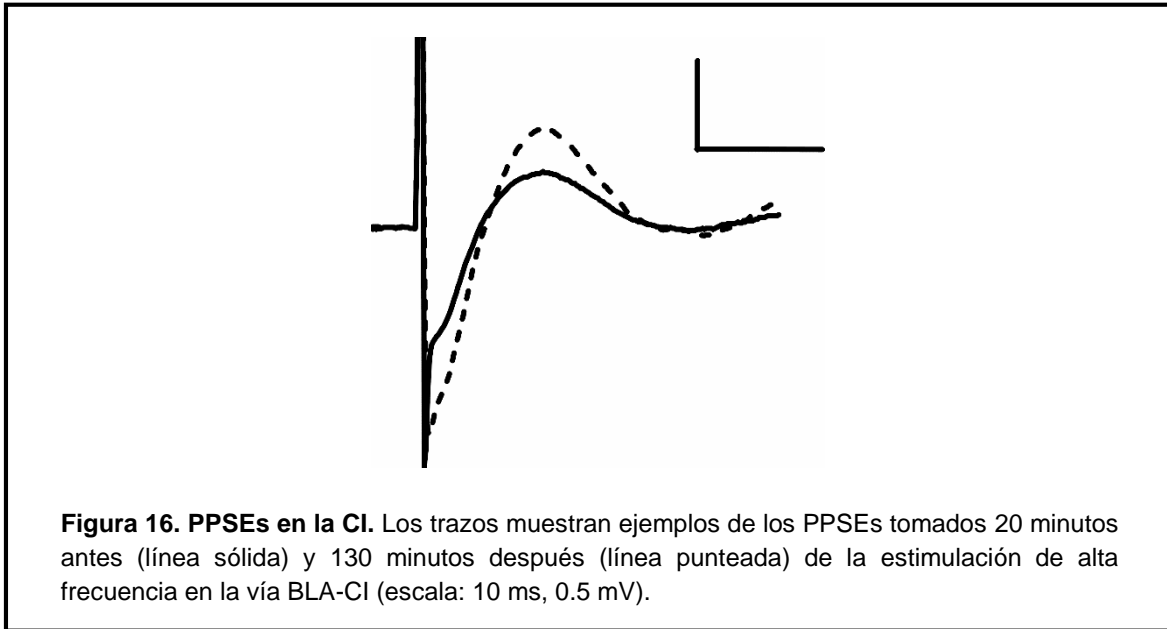
b) Resultados conductuales

No se observaron diferencias significativas entre los grupos durante el consumo basal de agua (línea base) ni durante el consumo de sacarina en la sesión de adquisición del CAS. El promedio de consumo de agua, en mililitros, durante la línea base (\pm EEM) fue de 18.20 ± 0.63 , 18.25 ± 0.36 , 20.45 ± 0.08 y 17.87 ± 0.36 para los grupos EXT+HFS, CAS+HFS, pCAS(EC)+HFS y pCAS(EI)+HFS, respectivamente. Por otro lado, los promedios de consumo de sacarina (en ml) durante la sesión de adquisición fueron los siguientes: 18.93 ± 0.64 , 18.03 ± 0.92 , 18.25 ± 0.48 y 19.26 ± 0.42 para los grupos EXT+HFS, CAS+HFS, pCAS(EC)+HFS y pCAS(EI)+HFS, respectivamente (Figura 15). El ANOVA factorial, comparando el consumo de sacarina en la prueba de aversión, mostró diferencias significativas entre los cuatro grupos mencionados $F_{(3,41)} = 169.90$, $p < 0.001$). Mientras que el análisis post-hoc, empleando la prueba de Fisher, reveló diferencias significativas entre los grupos entrenados (CAS+HFS; EXT+HFS) y los pseudoentrenados (pCAS(EI)+HFS; pCAS(EC)+HFS) ($p < 0.001$). Nótese que únicamente en los grupos en los que se asociaron los estímulos gustativo (EC) y aversivo (EI) se presentó CAS (Figura 15).

Asimismo, el grupo EXT+HFS, posterior a la prueba de aversión, presentó una curva de extinción de la respuesta condicionada, luego de 8 ensayos adicionales en los que sustituyó el agua por la solución sacarina (Figura 15).



Los PPSEs de la corteza insular consistieron en potenciales de 0.38 ± 0.02 mV (media ± EEM) inducidos por pulsos monofásicos de 50-70 μ A de 0.25 ms de duración. Estas respuestas comenzaron a los 2-3 ms post-estimulación presentando su cresta a los 7-9 ms con una pendiente promedio de 0.17 ± 0.01 (Figura 16), en concordancia con estudios previos (Rivera-Olvera et al., 2016; Rodríguez-Durán et al., 2017).



c) Resultados electrofisiológicos

La extinción de CAS permite la inducción pero no el mantenimiento de la LTP en la vía BLA-CI in vivo

Los resultados obtenidos por el presente trabajo muestran que, tras el proceso de extinción del CAS, es posible inducir LTP en la vía BLA-CI 48 h después de la última sesión de extinción. Sin embargo, el incremento en la pendiente de los PPSEs no persistió por más de 1h y terminó por regresar a valores propios de la línea base. En contraste, en los animales que sólo fueron entrenados en el CAS no fue posible generar LTP en la CI, 48 h después la prueba de aversión (Figura 17). Estos resultados concuerdan con lo reportado previamente por nuestro grupo de trabajo (Rodríguez-Durán et al., 2011; Rodríguez-Durán et al., 2014; Rivera-Olvera et al., 2016).

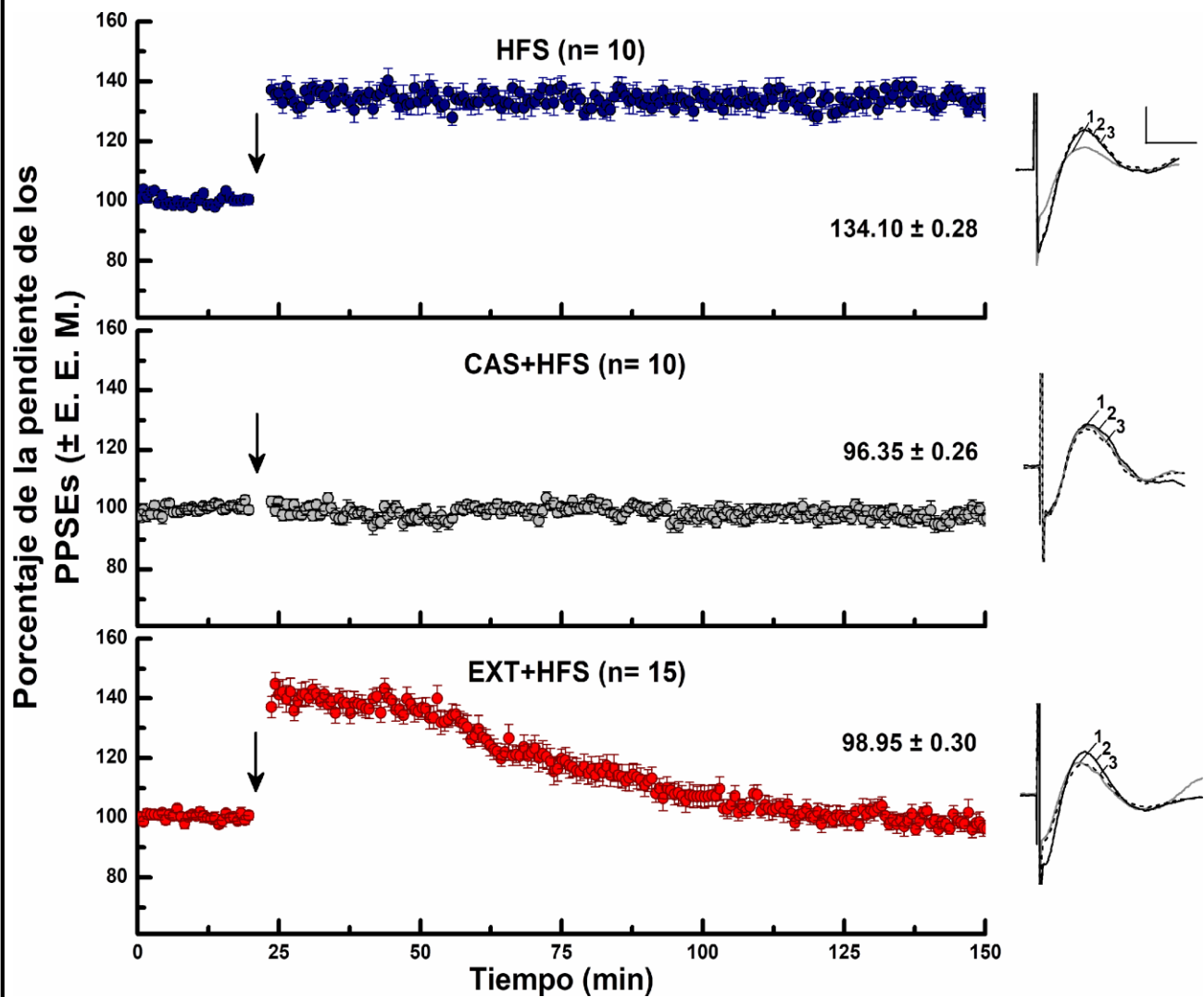


Figura 17. La extinción de CAS permite la inducción pero no el mantenimiento de la LTP en la vía BLA-CI *in vivo*. Gráficas donde se representa la media (\pm EEM) del porcentaje de la pendiente de los PPSEs con respecto a la línea base (100%) para los grupos HFS, CAS+HFS y EXT+HFS. Obsérvese que el entrenamiento en el CAS bloquea la inducción de LTP en la CI, mientras que los animales que fueron sometidos al proceso de extinción del CAS presentan inducción pero no mantenimiento de la LTP en la CI. 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 antes (1: línea gris), 20 minutos (2: línea negra) y 130 minutos (3: línea punteada) después de la estimulación de alta frecuencia. Los números al interior de cada gráfica representan la media (\pm EEM) de la pendiente de los PPSEs después de la estimulación de alta frecuencia para cada grupo. Escala: 0.5 mV, 10 ms.

Aunado a lo anterior, los animales que conformaron los grupos HFS (Figura 17), pCAS(EC)+HFS y pCAS(EI)+HFS (Figura 18), exhibieron LTP en la vía BLA-CI, demostrando que la asociación entre el EC y el EI es necesaria para producir la regulación homeostática que modifica el umbral para inducir subsecuente plasticidad sináptica en la CI. El ANOVA de medidas repetidas, comparando las pendientes de los PPSEs después de la estimulación de alta frecuencia, reveló diferencias significativas entre los cinco grupos, $F_{(4,50)}= 42.56$. Mientras que el análisis post-hoc con el test de Fisher, mostró que el grupo CAS+HFS presentó diferencias significativas al compararlo con el resto de los grupos ($p<0.001$). Adicionalmente, el análisis mostró que los grupos HFS, pCAS(EC)+HFS, pCAS (EI)+HFS y EXT+HFS no presentaron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon entre sí, mostrando que la extinción del CAS permite la posterior inducción de LTP en la vía BLA-CI *in vivo*. No obstante, el análisis estadístico de los valores de la pendiente de los PPSEs, para los últimos 20m del registro también reveló diferencias significativas entre los grupos, $F_{(4,50)}= 55.61$. Sin embargo, el análisis post-hoc ahora mostró que el grupo EXT+HFS fue estadísticamente diferente de los grupos HFS, pCAS(EC)+HFS y pCAS(EI)+HFS ($p<0.001$) y ya no del grupo CAS+HFS, mostrando que la extinción del CAS no permite el mantenimiento de la LTP en la CI. Estos resultados están en consonancia con los estudios que sugieren que la extinción no degrada la memoria original, sino que genera un nuevo aprendizaje (Maren, 2011; Maroun et al., 2012).

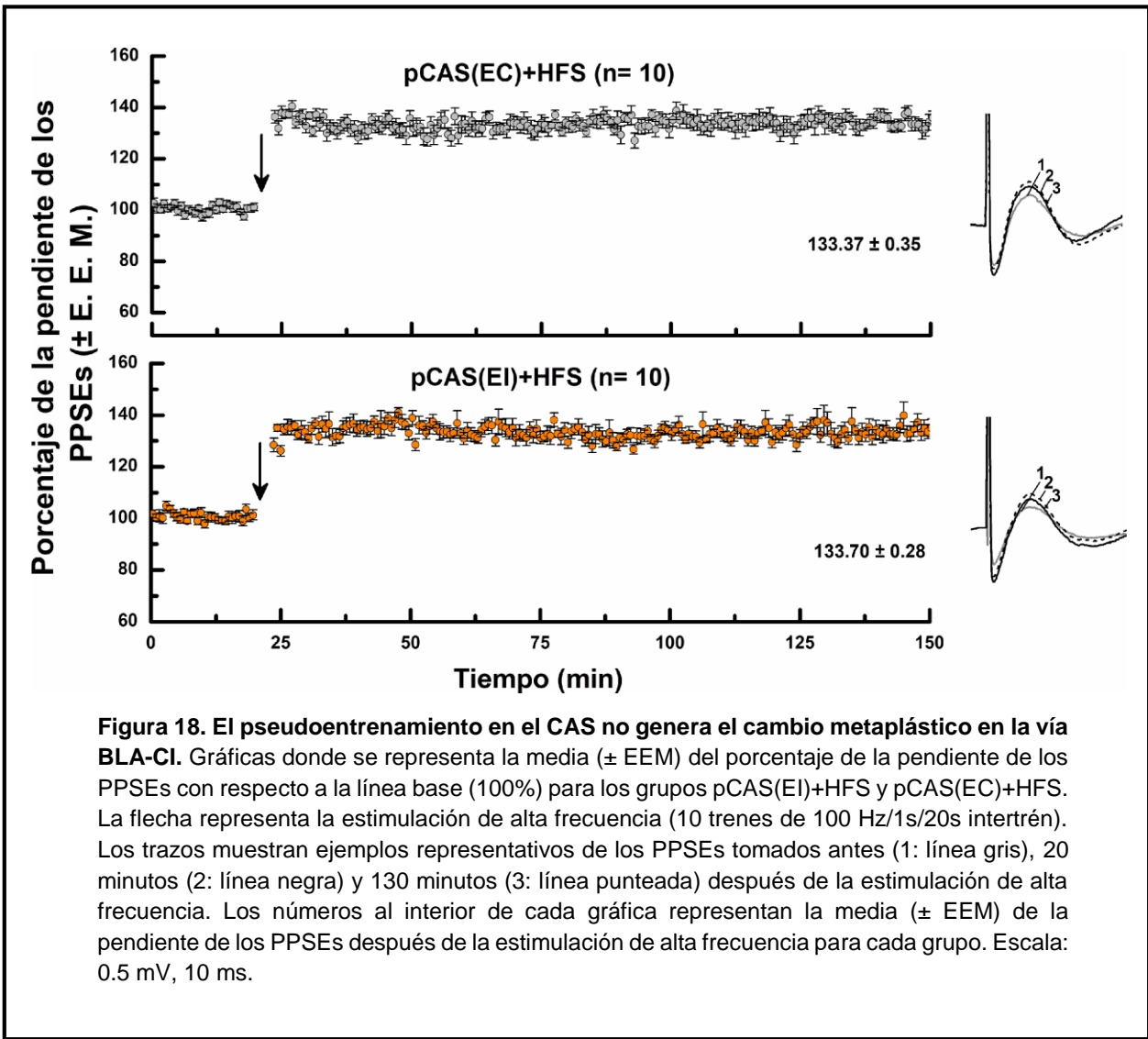
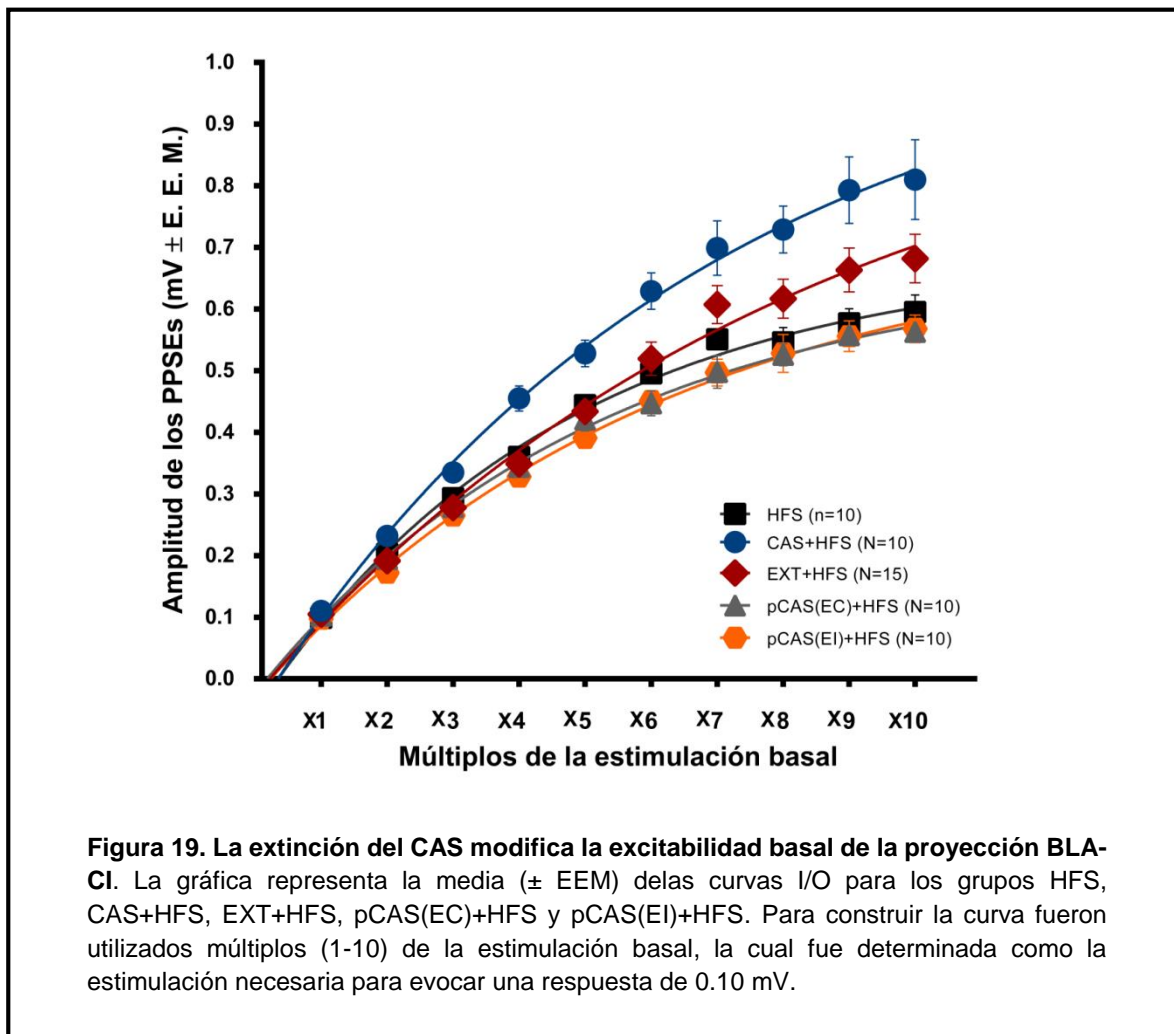


Figura 18. El pseudoentrenamiento en el CAS no genera el cambio metaplástico en la vía BLA-CI. Gráficas donde se representa la media (\pm EEM) del porcentaje de la pendiente de los PPSEs con respecto a la línea base (100%) para los grupos pCAS(EI)+HFS y pCAS(EC)+HFS. La flecha representa la estimulación de alta frecuencia (10 trenes de 100 Hz/1s/20s intertrén). Los trazos muestran ejemplos representativos de los PPSEs tomados antes (1: línea gris), 20 minutos (2: línea negra) y 130 minutos (3: línea punteada) después de la estimulación de alta frecuencia. Los números al interior de cada gráfica representan la media (\pm EEM) de la pendiente de los PPSEs después de la estimulación de alta frecuencia para cada grupo. Escala: 0.5 mV, 10 ms.

La extinción de CAS modifica la excitabilidad basal de la proyección BLA-CI.

El registro de las curvas I/O mostró que la adquisición y la extinción del CAS modifican la excitabilidad basal de la vía BLA-CI. El análisis de regresión no lineal de las curvas I/O reveló diferencias significativas entre el grupo CAS+HFS y los grupos pseudoentrenados ($p < 0.001$), sugiriendo que el CAS produce un incremento

en la eficiencia sináptica de la vía BLA-CI. Estos resultados concuerdan con lo reportado previamente por estudios de nuestro grupo de trabajo (Rivera-Olvera et al., 2016; Rodríguez-Durán et al., 2017). Asimismo, de manera interesante, la curva I/O para el grupo EXT+HFS presentó diferencias significativas en comparación con la de los animales pertenecientes a los grupos entrenados y pseudoentrenados en el CAS ($p < 0.001$). Estos resultados indican que el proceso de extinción revierte el incremento en la eficacia sináptica de la vía BLA-IC generado por el entrenamiento en el CAS (Figura 19).



d) Resultados moleculares

La extinción del CAS incrementa la expresión de CaN en la CI

Con el propósito de explorar parte de los mecanismos implicados en la regulación homeostática de la LTP en la vía BLA-CI, debido a la extinción del CAS, decidimos evaluar, por medio del ensayo de Western blot, la expresión de la proteína fosfatasa CaN y el estado fosforilado de la proteína Akt, uno de los blancos río abajo de la vía de señalización desencadenada por la PI-3K.

El análisis de los resultados obtenidos por el Western blot reveló que la extinción del CAS incrementa la expresión de CaN en la CI. Como se muestra en la Figura 20a, 48 h después de la novena sesión de extinción, la CI mostró un aumento significativo en los niveles de CaN, en comparación con los grupos CAS e INT (ANOVA de una vía; $F_{(2,6)}=14.38$, $p<0.001$). Por otro lado, el grupo CAS exhibió un incremento significativo en los niveles de p-Akt en comparación con los grupos EXT e INT (Figura 20b). Sin embargo, también se observaron diferencias significativas entre estos dos últimos grupos. El ANOVA de una vía mostró diferencias significativas entre los grupos, $F_{(2,6)}=48.74$, $p<0.001$. Estos resultados sugieren que el trazo de memoria generado por la extinción del CAS podría estar regulado por la expresión de CaN en la CI.

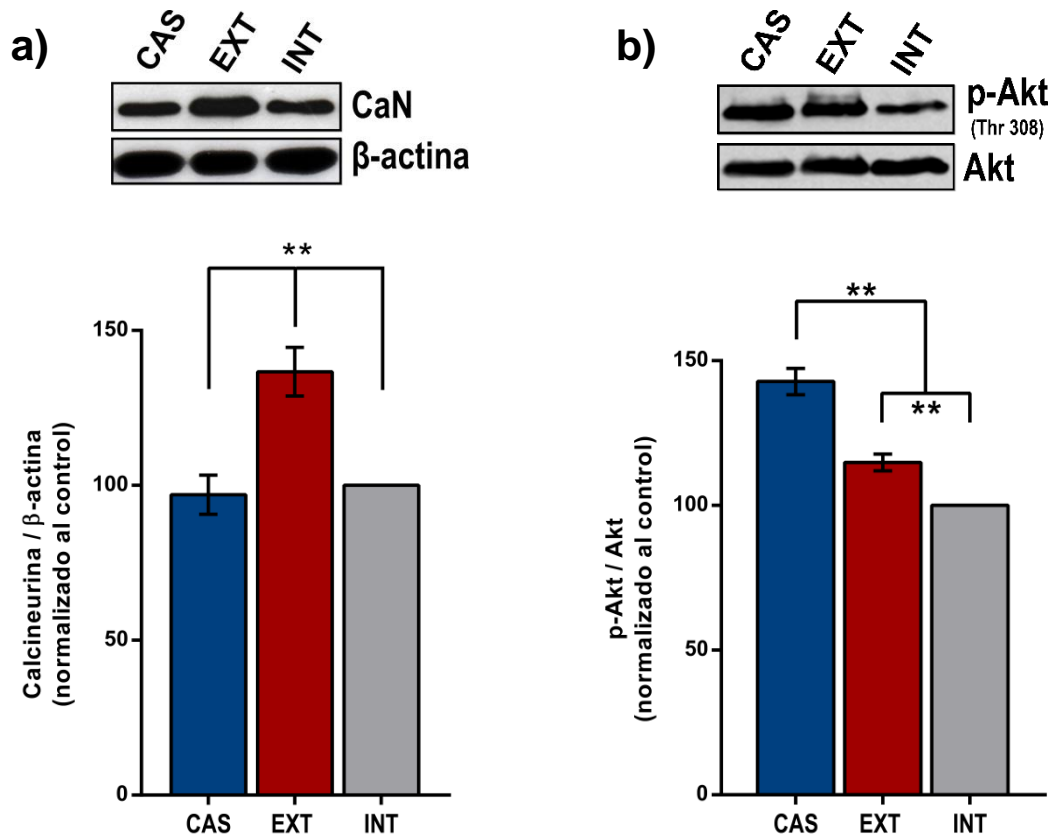


Figura 20. La extinción del CAS incrementa la expresión de CaN en la CI. Se muestran los Western blots representativos y el análisis densitométrico, en porcentaje con respecto al control de carga, para los niveles de CaN (A) y fosfo-Akt (p-Akt) (B) de la CI en cada grupo (CAS EXT e INT). Nótese que el proceso de extinción del CAS incrementa los niveles de CaN en la CI, en comparación con los grupos CAS e INT, además de disminuir los niveles de p-Akt en comparación con el grupo CAS, pero sin alcanzar los niveles de esta proteína para el grupo INT. ** $p < 0.01$.

VIII. DISCUSIÓN

El aprendizaje y la memoria son fenómenos asociados a modificaciones en la fortaleza de las conexiones sinápticas que dependen de patrones específicos de actividad neuronal (Citri y Malenka, 2008). Así, los cambios plásticos suelen manifestarse como expresiones de plasticidad hebbiana, que modifican progresivamente las propiedades de los circuitos neuronales, o como expresiones de plasticidad homeostática, promoviendo la estabilidad y el funcionamiento correcto de dichos circuitos (Turrigiano y Nelson, 2000).

Al día de hoy, 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, Heynen y Bear, 2009). En este sentido, se considera que mecanismos de plasticidad homeostática, como la metaplasticidad, juegan un papel crucial en la formación y la persistencia de la memoria (Abraham, 2008; Pérez-Otaño y Ehlers, 2005).

Por otra parte, se ha observado que la adquisición de memorias aversivas repercute en la capacidad de experimentar subsecuente plasticidad sináptica, modificando el umbral para inducir LTP o LTD (Yashiro y Philpot, 2008). En el presente trabajo evaluamos el efecto de la extinción de una memoria gustativa aversiva sobre la posterior inducción de LTP en la proyección que emerge del núcleo basolateral amigdalino hacia la corteza insular, un área neocortical que es considerada el relevo final de la vía gustativa.

Para tal fin, empleamos el condicionamiento de aversión a los sabores, una tarea conductual que es capaz de modular las propiedades de las neuronas en la CI, promoviendo modificaciones plásticas y cambios en la actividad de genes de expresión temprana, como el c-fos, en dicha región neocortical (Accolla y Carleton, 2008; Bernstein y Koh, 2007). Parte de los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el entrenamiento en el CAS previene la subsecuente inducción de LTP en la vía BLA-CI 48 h después de realizar la prueba de aversión. Estos resultados concuerdan con lo reportado previamente por estudios de nuestro grupo de investigación (Rivera-Olvera et al., 2016; Rodríguez-Durán et al., 2011; Rodríguez-Durán y Escobar, 2014). Sin embargo, el hallazgo principal de este trabajo reveló que cuando los animales son sometidos al proceso de extinción del CAS, el bloqueo para inducir posterior LTP en la vía BLA-CI es revertido. No obstante, la potenciación generada no persiste por más de una hora y decae hasta valores propios de la línea base. En este sentido, diversos estudios sugieren que el proceso de extinción implica la formación de una nueva memoria y que su consolidación requiere de eventos de plasticidad sináptica (Bouton, 2004; Li et al., 2016; Maroun et al., 2012; Mauk y Ohyama, 2004; Rescorla, 2001; Rodríguez-Serrano, Ramírez-León, Rodríguez-Durán, y Escobar, 2014).

En este mismo orden de ideas, en un estudio pionero, llevado a cabo por Accolla y Carleton, a través de la generación óptica de imágenes de actividad intrínseca cortical, se encontró que el entrenamiento en el CAS para un sabor dulce y placentero, generaba una representación en la CI parecida a la representación generada para un sabor amargo y desagradable. Sin embargo, de manera

interesante, cuando se entrenaba a los animales en la extinción del CAS, la representación cortical del estímulo se volvía a modificar, originando una representación, nuevamente similar a la de un sabor agradable (Accola y Carleton, 2008). Así, podemos entender a la extinción del CAS como un nuevo aprendizaje que interfiere o invalida la asociación original entre el estímulo condicionado y el incondicionado, modificando el umbral para la inducción de plasticidad sináptica subsecuente. Además, nuestros resultados sugieren que los cambios metaplásticos que ocurren después del entrenamiento en el CAS funcionan no sólo como protectores, sino como moduladores del almacenamiento de información, ya que dichos cambios parecen ser revertidos cuando se extingue el aprendizaje adquirido.

Desde otro punto de vista, algunos investigadores han considerado a la extinción de la memoria como un fenómeno de “desaprendizaje”, en el que los cambios plásticos generados por la adquisición de la memoria original, son revertidos a través de un proceso de depotenciación sináptica, es decir, un retorno de las sinapsis potenciadas a la línea de base (por ejemplo, LTD) (Dalton, Wang, Floresco y Phillips, 2008; Hong et al., 2009; Li et al., 2016; Myers et al., 2007).

En este mismo orden de ideas, en un estudio reciente llevado a cabo por nuestro grupo de trabajo, se observó que la inducción de LTD en la proyección BLA-CI previa al entrenamiento en el CAS facilita la extinción de esta tarea. Por el contrario, la inducción de LTP previo a la adquisición del CAS mejora la retención de este aprendizaje, sugiriendo una modulación bidireccional de la extinción del CAS en respuesta a la LTP o LTD de la proyección BLA-CI y, proporcionando

además, evidencia de una regulación homeostática del aprendizaje gustativo (Rodríguez-Durán et al., 2017). Del mismo modo, Rogan y colaboradores demostraron que el condicionamiento de miedo a un tono, incrementa las respuestas evocadas por dicho estímulo en las neuronas de la proyección tálamo-amígdala lateral de ratones registrados en libre movimiento. Sin embargo, estas respuestas presentaron una depotenciación de su respuesta cuando el tono, que resultaba aversivo a los animales, era entrenado como un estímulo seguro (Rogan, Leon, Pérez y Kandel, 2005).

Lo anterior sugiere que la LTP generada por el aprendizaje puede ser revertida durante el entrenamiento de extinción de la tarea, a través de procesos sinápticos relacionados con la LTD (o depotenciación) de las conexiones neuronales. Aunado a esto, en un estudio reciente realizado por Li y colaboradores, se encontró que la extinción del CAS conlleva a la reducción de la eficiencia sináptica de circuitos corticales en la ínsula, respaldando un vínculo funcional entre la LTD de la CI y la extinción del CAS (Li et al., 2016). En este sentido, el presente estudio, mediante el registro y análisis de curvas *entrada-salida* para las respuestas evocadas por la CI, reveló que el entrenamiento en el CAS fortalece la eficiencia de la comunicación entre el BLA y la CI, mientras que la extinción revierte dicho fortalecimiento. Estos datos sugieren que el proceso de extinción del CAS es capaz, por sí mismo, de alterar el estado de la transmisión sináptica basal de la vía BLA-CI generado por la memoria de aversión al sabor. Así, la disminución en la excitabilidad basal de esta vía podría conducir a un cambio en el umbral para la generación de la plasticidad sináptica posterior. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado

previamente por Kim y colaboradores, en donde se demostró que el entrenamiento en la extinción del condicionamiento de miedo generaba depotenciación de la transmisión sináptica basal de la amígdala lateral, previamente potenciada por la adquisición de la memoria de miedo. Además, en dicho estudio también se encontró que la extinción es capaz de inhibir la generación de LTD ex vivo en rebanadas cerebrales de los animales entrenados (Kim et al., 2007). Estos hallazgos, junto con los reportados en este trabajo, apoyan la existencia de una regulación homeostática, concisa y dinámica, de los circuitos neuronales para la apropiada función conductual.

En la actualidad, múltiples evidencias indican que los mecanismos bioquímicos y moleculares de la depotenciación son opuestos a los de la LTP, lo que sugiere un papel específico para actores moleculares como las cinasas y fosfatasas en el control bidireccional de la fortaleza sináptica (Lisman, 1994). Por lo tanto, se conoce que la LTP está asociada a la fosforilación de distintas proteínas, entre las que se encuentran CaMKII, MAPK, y Akt uno de los sustratos río abajo de la vía de señalización activada por la PI3K, así como una regulación a la baja de la actividad de algunas proteínas fosfatasas y la fosforilación e inserción en la membrana de receptores AMPA (Malinow y Malenka 2002; Riedel 1999). La depotenciación, en contraste, está asociada a la desfosforilación de las proteínas Akt, MAPK y CaMKII; al incremento en la actividad de proteínas fosfatasas, incluyendo a la calcineurina y a la proteína fosfatasa 1 (PP1); y a la desfosforilación e internalización de los receptores AMPA (Zhou y Poo 2004, Lin et al., 2003c). Por tanto, mientras que la estimulación de alta frecuencia, inductora de LTP, involucra

cascadas de segundos mensajeros que culminan en transcripción génica y síntesis de proteínas, la estimulación de baja frecuencia, inductora de LTD, contrarresta esos efectos en cada nivel. De acuerdo con esta evidencia, en nuestro presente estudio buscamos conocer el estado de algunos de estos actores moleculares después de la adquisición y la extinción del CAS. Para ello, evaluamos el estado fosforilado de la proteína Akt y los niveles de expresión de CaN en la CI mediante ensayos de Western blot. Los resultados obtenidos mostraron que la extinción del CAS incrementa la expresión de la proteína fosfatasa CaN en la CI, 48 h después de la última sesión de extinción. Por otra parte, la extinción también es capaz de disminuir la fosforilación de la proteína Akt (Th308) en la CI, sugiriendo un proceso de depotenciación de la eficiencia sináptica de la proyección BLA-CI como resultado de un proceso metaplásico regulador del trazo de memoria previamente generado por el CAS.

Por otra parte, se conoce poco acerca de los mecanismos moleculares de la metaplasticidad, sin embargo, diversos autores sugieren que la modulación de la actividad de proteínas cinasas y fosfatasas puede modificar el umbral para la inducción de plasticidad sináptica (Bear, 2003; Jedlicka, 2002; Zhang et al., 2005). Por otra parte, dada la capacidad de los receptores NMDA para funcionar como una compuerta para la inducción de varias formas de plasticidad sináptica, los cambios en la función de estos receptores son claramente el modo más directo de alterar los umbrales para la generación de cambios plásticos (MacDonald, Jackson y Beazely, 2006).

En este sentido, se ha propuesto un mecanismo mediante el cual los cambios en el umbral para generar plasticidad sináptica son dependientes de la proporción de las subunidades del receptor NMDA (Philpot et al., 2007; Quinlan et al., 1999; Quinlan et al., 2004). La subunidad GluN2A tiene una cinética más rápida, es decir, los canales NMDA que contienen la subunidad GluN2A abren y cierran un mayor número de veces que cuando dichos canales contienen la subunidad GluN2B (Erreger et al., 2005). Este efecto produce que los receptores NMDA que contengan subunidades GluN2A, 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 GluN2B tendrán una mayor resolución ante estímulos de baja frecuencia, como los que inducen LTD (Pérez-Otaño y Ehlers, 2005; Shipton y Paulsen, 2014; Yashiro y Philpot, 2008).

A este respecto, se sabe que la proteína CaN juega un papel importante en la promoción de la endocitosis del receptor NMDA conformado por la subunidad GluN2B (Snyder et al., 2001). Asimismo, esta fosfatasa puede reducir el tiempo de apertura del canal de dicho receptor (Lieberman y Mody, 1994; Shi et al., 2000; Tong et al., 1995), conduciendo a una entrada reducida de calcio a través de éste y, por tanto, favoreciendo la inducción de LTD. En relación con lo anterior, en un estudio previo realizado por Winder y colaboradores en 1998, se observó que la sobreexpresión de CaN, en la región CA1 de ratones, es capaz de inhibir la fase tardía de la LTP (L-LTP, por sus siglas en inglés) pero no la temprana (E-LTP, por sus siglas en inglés) (Winder, Mansuy, Osman, Moallem y Kandel, 1998). En concordancia con la anterior, los resultados aquí obtenidos muestran que la

extinción del CAS incrementa los niveles de CaN en la CI. Además, pese a que los animales con extinción del CAS presentaron LTP en la CI, esta potenciación no se mantuvo por más de 1 hora (E-LTP).

IX. CONCLUSIONES

Los resultados derivados del presente estudio muestran que:

1. La extinción del CAS permite la subsecuente inducción, pero no el mantenimiento, de la LTP en la proyección BLA-CI in vivo.
2. La extinción del CAS revierte el incremento en la excitabilidad basal de las neuronas de la proyección BLA-CI, generado por el entrenamiento en el CAS. Sugiriendo una modificación en el umbral para la inducción de subsecuente plasticidad sináptica.
3. La extinción del CAS incrementa la expresión de la proteína fosfatasa CaN en la CI.
4. El entrenamiento en el CAS incrementa los niveles de p-Akt en la CI.

En resumen, los resultados de este trabajo muestran que la extinción del CAS regula de forma homeostática, la respuesta de la vía BLA-CI a eventos posteriores de plasticidad sináptica, probablemente a través de la disminución de la excitabilidad basal de la vía y del incremento en los niveles de CaN en la CI.

X. LITERATURA CITADA

Abbott, L. F., & Nelson, S. B. (2000). Synaptic plasticity: taming the beast. *Nature Neuroscience*, 3(Suppl), 1178–1183.

Abraham, W.C., & Bear, M.F. (1996). Metaplasticity: the plasticity of synaptic plasticity. *Trends in Neuroscience*, 19, 126-130.

Abraham, W.C., & Hugett, A. (1997). Induction and reversal of long-term potentiation by repeated high-frequency stimulation in rat hippocampal slices. *Hippocampus*, 7, 137-145.

Abraham, W.C., (2008). Metaplasticity: tuning synapses and networks for plasticity. *Nature Review Neuroscience*, 9(5), 387.

Accolla, R., & Carleton, A. (2008). Internal body state influences topographical plasticity of sensory representations in the rat gustatory cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(10), 4010-4015.

Almeida-Corrêa, S., Moulin, T. C., Carneiro, C. F. D., Gonçalves, M. M. C., Junqueira, L. S., & Amaral, O. B. (2015). Calcineurin inhibition blocks within-, but not between-session fear extinction in mice. *Learning & Memory*, 22 (3), 159–169.

An, S., Yang, J. W., Sun, H., Kilb, W., & Luhmann, H. J. (2012). Long-term potentiation in the neonatal rat barrel cortex in vivo. *The Journal of Neuroscience*, 32(28), 9511-6.

Ascher, P., Bregestovski, P., & Nowak, L. (1988). N-methyl-D-aspartate-activated channels of mouse central neurones in magnesium-free solutions. *Journal of Physiology*, 399, 207-226.

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

Barros-Zulaica, N., Castejon, C., & Nuñez, A. (2014). Frequency-specific response facilitation of supra and infragranular barrel cortical neurons depends on NMDA receptor activation in rats. *Neuroscience*, 281C: 178-194.

Bear, M.F., & Kirkwood, A. (1993). Neocortical Long-term potentiation. *Current Opinion in Neurobiology*, 3, 197-202.

Bear, M.F. (1996). A synaptic basis for memory storage in the cerebral cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 13453-13459.

Bear, M.F. (2003). Bidirectional synaptic plasticity: from theory to reality. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 358, 649-655.

Bear, M.F., Connors, B. W., & Paradiso, M.A. (2001). *Neuroscience: exploring the brain*. Baltimore, Md.: Lippincott Williams & Wilkins.

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 (5512), 2417–2419.

Berman, D. E., Hazvi, S., Stehberg, J., Bahar, A., & Dudai, Y. (2003). Conflicting processes in the extinction of conditioned taste aversion: behavioral and molecular aspects of latency, apparent stagnation, and spontaneous recovery. *Learning & Memory*, 10 (1), 16–25.

Bermúdez-Rattoni, F., & McGaugh, J.L. (1991). Insular cortex and amygdala lesions differentially affect acquisition on inhibitory avoidance and conditioned taste aversion. *Brain Research*, 549, 165-170.

Bermúdez-Rattoni, F. (2004). Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nature Review Neuroscience* 5, 209-217.

Bermúdez-Rattoni, F. (2014). The forgotten insular cortex: Its role on recognition memory formation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 109C, 207–216.

Bermúdez-Rattoni, F., Nunez-Jaramillo, L., & Balderas, I. (2005). Neurobiology of taste-recognition memory formation. *Chemical Senses*, 30 Suppl 1, i156-157.

Bernstein, I.L., & Koh, M.T. (2007). Molecular signaling during taste aversion learning. *Chemical Senses*, 32, 99-103.

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. *The Journal of Neuroscience*, 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. *Journal of Physiology*, 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. *Journal of Physiology*, 232, 331-356.

Boehm, J., Kang, M.G., Johnson, R.C., Esteban, J., Huganir, 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.

Bouton, M. E. (2004). Context and behavioral processes in extinction. *Learning & Memory*, 11(5), 485–494.

Bouton, M. E., Westbrook, R. F., Corcoran, K. A., & Maren, S. (2006). Contextual and temporal modulation of extinction: behavioral and biological mechanisms. *Biological Psychiatry*, 60 (4), 352–360.

Bradley, R.M., & Mistretta, C.M. (1971). Intravascular taste in rats as demonstrated by conditioned aversion to sodium saccharin. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 75, 186-189.

Bramham, C. R., Southard, T., Sarvey, J. M., Herkenham, M., & Brady, L. S. (1996). Unilateral LTP triggers bilateral increases in hippocampal neurotrophin and trk receptor mRNA expression in behaving rats: evidence for interhemispheric communication. *The Journal of Comparative Neurology*, 368(3), 371-82.

Bures, J., & Buresova, O. (1989). Conditioned taste aversion elicited by intracerebral administration of drugs. *Acta Physiologica Hungarica*, 74, 77-93.

Calabresi, P., Napolitano, M., Centonze, D., Marfia, G.A., Gubellini, P., Teuele, M.A., Berretta, N., Bernardi, G., Frati, L., Tolú, M., & Gulino, A. (2000). Tissue plasminogen activator controls multiple forms of synaptic plasticity and memory. *European Journal of Neuroscience*, 12, 1002-10012.

Chen, T., Koga, K., Descalzi, G., Qiu, S., Wang, J., Zhang, L. S., Zhang, Z. J., He, X. B., Qin, X., Xu, F. Q., Hu, J., Wei, F., Huganir, R. L., Li, Y. Q., & Zhuo, M. (2014). Postsynaptic potentiation of corticospinal projecting neurons in the anterior cingulate cortex after nerve injury. *Molecular Pain*, 10, 1-16.

Chen, X., Garelick, M. G., Wang, H., Lil, V., Athos, J., & Storm, D. R. (2005). PI3 kinase signaling is required for retrieval and extinction of contextual memory. *Nature Neuroscience*, 8 (7), 925–931.

Chun, S., Bayazitov, I.T., Blundon, J.A., & Zakharenko, S.S. (2013). Thalamocortical long-term potentiation becomes gated after the early critical period in the auditory cortex. *The Journal of Neuroscience*, 33(17), 7345-57.

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.

Clugnet, M.C., Ledoux, J.E., & Morrison, S.F. (1990). Unit responses evoked in amygdala and striatum by electrical stimulation of the medial geniculate body. *The Journal of Neuroscience*, 10, 1055-1061.

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. *Journal of Neurophysiology*, 82, 3139-3148.

Cooper, L. N., & Bear, M. F. (2012). The BCM theory of synapse modification at 30: interaction of theory with experiment. *Nature Review Neuroscience*, 13(11), 798-810.

Dalton, G. L., Wang, Y. T., Floresco, S. B., & Phillips, A. G. (2008). Disruption of AMPA receptor endocytosis impairs the extinction, but not acquisition of learned fear. *Neuropsychopharmacology*, 33(10), 2416-2426.

De Roo, M., Klauser, P., García, P. M., Poglia, L., & Muller, D. (2008). Spine dynamics and synapse remodeling during LTP and memory processes. *Progress in Brain Research*, 169, 199-207.

Delamater A. R. (2004). Experimental extinction in Pavlovian conditioning: behavioural and neuroscience perspectives. *Quarterly Journal of Experimental Psychology. B*, 57(2), 97-132.

Derrick, B.E., Weinberger, S.B., & Martinez, J.L Jr. (1991). Opioid receptors are involved in a NMDA receptor-independent mechanism of LTP induction at hippocampal Mossy Fiber-CA3 synapses. *Brain Research Bulletin*, 27, 219-233.

Domjan, M. (1985). Cue-consequence specificity and long-delay learning revisited. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 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. *Learning & Memory*, 15, 112-116.

Eichenbaum, H. (1996). Learning from LTP: a comment on recent attempts to identify cellular and molecular mechanisms of memory. *Learning and Memory*, 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. *Journal of Physiology*, 563, 345-358.

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., & Bermúdez-Rattoni, F. (2000). Long-term potentiation in the insular cortex enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Research*, 852, 208-212.

Escobar, M. L., Alcocer, I., & 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. *Behavioral Brain Research*, 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 Research*, 812, 246-251.

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

Escobar, M. L., Chao, V., & Bermudez-Rattoni, F. (1998b). In vivo long-term potentiation in the insular cortex: NMDA receptor dependence. *Brain Research*, 779, 314-319.

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 Research*, 478, 368-374.

Escobar, M.L., & Derrick, B. (2007) Long-term potentiation and depression as putative mechanisms for memory formation. *Neural plasticity and memory: From Genes to Brain Imaging*. Federico BermúdezRattoni. Ed. CRC Press, pp: 15-46.

Feldman, D. E. (2012). The spike-timing dependence of plasticity. *Neuron*, 75, 556–571.

Fiorenza, N. G., Rosa, J., Izquierdo, I., & Myskiw, J. C. (2012). Modulation of the extinction of two different fear-motivated tasks in three distinct brain areas. *Behavioural Brain Research*, 232 (1), 210–216.

Fu, M., Yu, X., Lu, J. & Zuo, Y. (2012). Repetitive motor learning induces coordinated formation of clustered dendritic spines in vivo. *Nature*, 483, 92–95.

Funauchi, M., Haruta, H., & Tsumoto, T. (1994). Effects of an inhibitor for calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase, calcineurin, on induction of long-term potentiation in rat visual cortex. *Neuroscience Research*, 19(3), 269-278.

Gambino, F., Pagès, S., Kehayas, V., Baptista, D., Tatti, R., Carleton, A., & Holtmaat, A. (2014). Sensory-evoked LTP driven by dendritic plateau potentials in vivo. *Nature*, 515(7525), 116-9.

Garcia, J., & Koelling, R.A. (1966). Relation of cue to consequence in avoidance learning. *Psychonomic Science* 4, 123-124.

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., Lasiter, P.S., Bermudez-Rattoni, F., & Deems, D.A. (1985). A general theory of aversion learning. *Annals of the New York Academy of Sciences* 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 Research Bulletin*, 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. *The Journal of Neuroscience*, 28, 2864-2873.

Guo, Y., Zhang, W., Chen, X., Fu, J., Cheng, W., Song, D., Qu, X., Yang, Z., & Zhao, K. (2017). Timing-dependent LTP and LTD in mouse primary visual cortex following different visual deprivation models. *PLoS One*, 12(5), e0176603.

Hager, A. M., Gagolewicz, P. J., Rodier, S., Kuo, M.-C., Dumont, É. C., & Dringenberg, H. C. (2015). Metaplastic up-regulation of LTP in the rat visual cortex by monocular visual training: Requirement of task mastery, hemispheric specificity, and NMDA-GluN2B involvement. *Neuroscience*, 293, 171–186.

Han, J. H., Kushner, S. A., Yiu, A. P., Cole, C. J., Matynia, A., Brown, R. A., Neve, R. L., Guzowski, J. F., Silva, A. J., & Josselyn, S. A. (2007). Neuronal competition and selection during memory formation. *Science*, 316, 457–460.

Han, J. H., Kushner, S. A., Yiu, A. P., Hsiang, H. L., Buch, T., Waisman, A., Bontempi, B., Neve, R. L., Frankland, P. W., & Josselyn, S. A. (2009). Selective erasure of a fear memory. *Science*, 323, 1492–1496.

Hasan, M. T., Hernández-González, S., Dogbevia, G., Treviño, M., Bertocchi, I., Gruart, A., & Delgado-García, J. M. (2013). Role of motor cortex NMDA receptors in learning-dependent synaptic plasticity of behaving mice. *Nature Communications*, 4, 2258.

He, K., Huertas, M., Hong, S. Z., Tie, X., Hell, J. W., Shouval, H., & Kirkwood, A. (2015). Distinct Eligibility Traces for LTP and LTD in Cortical Synapses. *Neuron*, 88(3), 528-538.

Hebb, D. (1949). The organization of behavior. *The Journal of Theoretical Biology*, 2, 204-35.

Herry, C., Ferraguti, F., Singewald, N., Letzkus, J. J., Ehrlich, I., & Lüthi, A. (2010). Neuronal circuits of fear extinction. *European Journal of Neuroscience*, 31(4), 599-612.

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.

Hirsch, J.C., & Crepel, F. (1990) Use-dependent changes in synaptic efficacy in the rat prefrontal neurons in vitro. *Journal of Physiology*, 427, 32-49.

Hofer, S. B., Mrsic-Flogel, T. D., Bonhoeffer, T., & Hübener, M. (2009). Experience leaves a lasting structural trace in cortical circuits. *Nature*, 457, 313-317.

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.

Hong, I., Song, B., Lee, S., Kim, J., Kim, J., & Choi, S. (2009). Extinction of cued fear memory involves a distinct form of depotentiation at cortical input synapses onto the lateral amygdala. *European Journal of Neuroscience*, 30, 2089-2099.

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. *Bratislavske lekarske 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. *The Journal of Neuroscience*, 19, RC36.

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

Kanter, E. D., & Haberly, L. B. (1993). Associative long-term potentiation in piriform cortex slices requires GABA-A blockade. *The Journal of Neuroscience*, 13(6), 2477-82.

Kelleher, R. J. 3rd, Govindarajan, A., Jung, H. Y., Kang, H., & Tonegawa, S. (2004). Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory. *Cell*, 116(3), 467-79.

Kim, J., Lee, S., Park, K., Hong, I., Song, B., Son, G., Park, H., Kim, W. R., Park, E., Choe, H. K., Kim, H., Lee, C., Sun, W., Kim, K., Shin, K. S., & Choi, S. (2007). Amygdala depotentiation and fear extinction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(52), 20955-20960.

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 Research*, 659, 263-266.

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

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 Research*, 1008, 116-119.

Klein, S. B. (1997). *Aprendizaje: principios y aplicaciones*. Madrid: McGraw-Hill.

Komatsu, Y., Fuji, K., Maedan, J., Sakaguchi, H., & Tomaya, K. (1988). Long-term potentiation of synaptic transmission in kitten visual cortex. *Journal of Neurophysiology*, 59, 24-141.

Lamprecht, R., & LeDoux, J. (2004). Structural plasticity and memory. *Nature Review Neuroscience*, 5(1), 45-54.

Lasiter, P.S., Deems, D.A., Oetting, R.L., & Garcia, J. (1985). Taste discriminations in rats lacking anterior insular gustatory neocortex. *Physiology & Behavior*, 35, 277-285.

Ledoux, J.E. (1993). Emotional memory: in search of systems and synapses. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 702, 149-157.

Li, W.-G., Liu, M.-G., Deng, S., Liu, Y.-M., Shang, L., Ding, J., Hsu, T.-T., Jiang, Q., Li, Y., Li, F., Zhu, M. X., & Xuc, T.-L. (2016). ASIC1a regulates insular long-term depression and is required for the extinction of conditioned taste aversion. *Nature Communications*, 7, 13770.

Lieberman, D. N., & Mody, I. (1994). Regulation of NMDA channel function by endogenous Ca (2+)-dependent phosphatase. *Nature*, 369(6477), 235-239.

Lin, C. H., Lee, C. C., Gean, & P. W. (2003a). Involvement of a calcineurin cascade in amygdala depotentiation and quenching of fear memory. *Molecular Pharmacology*, 63(1), 44-52.

Lin, C. H., Yeh, S. H., Leu, T. H., Chang, W. C., Wang, S. T., & Gean, P. W. (2003b). Identification of calcineurin as a key signal in the extinction of fear memory. *The Journal of Neuroscience*, 23, 1574–1579.

Lin, C. H., Yeh, S. H., Lin, C. H., Lu, K. T., Leu, T. H., Chang, W. C., & Gean, P. W. (2001). A role for the PI-3 kinase signaling pathway in fear conditioning and synaptic plasticity in the amygdala. *Neuron*, 31(5), 841-851.

Lin, C. H., Yeh, S. H., Lu, H. Y., & Gean, P. W. (2003c). The Similarities and Diversities of Signal Pathways Leading to Consolidation of Conditioning and Consolidation of Extinction of Fear Memory. *The Journal of Neuroscience*, 23(23), 8310-8317.

Lisman, J. (1994) The CaM kinase II hypothesis for the storage of synaptic memory. *Trends in Neurosciences*, 17, 406–412.

Liu, X., Ramirez, S., Pang, P. T., Puryear, C. B., Govindarajan, A., Deisseroth, K., & Tonegawa, S. (2012). Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall. *Nature*, 484, 381-5.

Lømo, T. (1966). Frequency potentiation of excitatory synaptic activity in the dentate area of the hippocampal formation. *Acta Physiologica Scandinavica*, 128.

Losi, G., Prybylowski, K., Fu, Z., Lou, J.H., & Vicini, S. (2002). Silent synapses in developing cerebellar granule neurons. *Journal of Neurophysiology*, 87, 1263-1270.

Lu, K. T., Walker, D. L., & Davis, M. (2001). Mitogen-activated protein kinase cascade in the basolateral nucleus of amygdala is involved in extinction of fear-potentiated startle. *The Journal of Neuroscience*, 21, RC162.

Lynch, M.A. (2004). Long-term potentiation and memory. *Physiological Reviews*, 84, 87-136.

Macdonald, J.F., Jackson, M.F., & Beazely, M.A. (2006). Hippocampal long-term synaptic plasticity and signal amplification of NMDA receptors. *Critical Reviews in Neurobiology*, 18, 71-84.

Malenka, R., & Nicoll, R. (1993). NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms, *Trends in Neuroscience*, 16: 521-527.

Malenka, R. (2003). The long-term potential of LTP. *Nature Review Neuroscience*, 4, 923-926.

Malenka, R.C., & Bear, M.F. (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron*, 44, 5-21.

Malenka, R.C. (1991). Postsynaptic factors control the duration of synaptic enhancement in area CA1 of the hippocampus. *Neuron*, 6, 53-60.

Malinow, R., & Malenka, R. C. (2002). AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annual Review of Neuroscience*, 25, 103–126.

Mansuy, I. M. (2003). Calcineurin in memory and bidirectional plasticity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 311(4), 1195-208.

Marek, R., Coelho, C. M., Sullivan, R. K., Baker-Andresen, D., Li, X., Ratnu, V., Dudley, K. J., Meyers, D., Mukherjee, C., Cole, P. A., Sah, P., & Bredy, T. W. (2011). Paradoxical enhancement of fear extinction memory and synaptic plasticity by inhibition of the histone acetyltransferase p300. *The Journal of Neuroscience*, 31(20), 7486-91.

Maren, S. (2011). Seeking a spotless mind: extinction, deconsolidation, and erasure of fear memory. *Neuron*, 70(5), 830-845.

Maroun, M., Kavushansky, A., Holmes, A., Wellman, C., & Motanis, H. (2012). Enhanced extinction of aversive memories by high-frequency stimulation of the rat infralimbic cortex. *PLoS ONE*, 7(5), e35853.

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

Mauk, M. D., & Ohyama, T. (2004). Extinction as new learning versus unlearning: considerations from a computer simulation of the cerebellum. *Learning & Memory*, 11(5), 566–571.

Mcgaugh, J. L., Castellano, C., & Brioni, J. (1990). PicROTOXIN enhances latent extinction of conditioned fear. *Behavioral Neuroscience*, 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.

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.

Moriguchi, S., Han, F., Nakagawasai, O., Tadano, T., & Fukunaga, K. (2006). Decreased calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C activities mediate impairment of hippocampal long-term potentiation in the olfactory bulbectomized mice. *Journal of Neurochemistry*, 97(1), 22-9.

Morimoto, K., Sato, K., Sato, S., Yamada, N., & Hayabara, T. (1998). Time-dependent changes in neurotrophic factor mRNA expression after kindling and long-term potentiation in rats. *Brain Research Bulletin*, 45(6), 599-605.

Morrison, G. L., Fontaine, C. J., Harley, C. W., & Yuan, Q. (2013). A role for the anterior piriform cortex in early odor preference learning: evidence for multiple olfactory learning structures in the rat pup. *Journal of Neurophysiology*, 110(1), 141-52.

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.

Muellbacher, W., Ziemann, U., Boroojerdi, B., Cohen, L. & Hallett, M. (2001). Role of the human motor cortex in rapid motor learning. *Experimental Brain Research*, 136(4), 431-8.

Mulkey, R. M., Endo, S., Shenolikar, S., & Malenka, R. C. (1994). Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. *Nature*, 369(6480), 486-488.

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. *European Journal of Neuroscience*, 25, 3461-3468.

Muñoz-Cuevas, F. J., Athilingam, J., Piscopo, D., & Wilbrecht, L. (2013). Cocaine-induced structural plasticity in frontal cortex correlates with conditioned place preference. *Nature Neuroscience*, 16, 1367–1369.

Myers, K. M., & Davis, M. (2002). Behavioral and neural analysis of extinction. *Neuron*, 36 (4), 567–584.

Myers, k. M., Ressler, K., J., & Davis, M. (2006). Different mechanisms of fear extinction dependent on length of time since fear acquisition. *Learning & Memory*, 13(2), 216–223.

Nabavi, S., Fox, R., Proulx, C. D., Lin, J. Y., Tsien, R. Y., & Malinow, R. (2014). Engineering a memory with LTD and LTP. *Nature*, 511, 348-52.

Naro, A., Russo, M., Leo, A., Bramanti, P., Quartarone, A., & Calabrò, R. S. (2014). A Single Session of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation Over the Dorsolateral Prefrontal Cortex in Patients with Unresponsive Wakefulness Syndrome: Preliminary Results. *Neurorehabilitation and Neural Repair*, 24, 1-11.

Nelson, S. B., & Turrigiano, G. G. (2008). Strength through diversity. *Neuron*, 60(3), 477-82.

Nicoll, R., & Malenka, R. (1995). Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 377 (6545), 115-118.

Nicoll, R. A. (2017). A Brief History of Long-Term Potentiation. *Neuron*, 93(2), 281-290.

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. *Journal of Comparative Neurology*, 150, 217-237.

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 Research*, 1197, 32-39.

Paxinos, G., & Watson, C. (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. (7a ed.). San Diego EU: Elsevier Academic Press.

Pérez-Otaño, I., & Ehlers, M.D. (2005). Homeostatic plasticity and NMDA receptor trafficking. *Trends in Neuroscience*, 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.

Pozo, K., & Goda, Y. (2010). Unraveling mechanisms of homeostatic synaptic plasticity. *Neuron*, 66(3), 337-351.

Pritchard, T.C., Hamilton, R.B., Morse, J.R., & Norgren, R. (1986). Projections of thalamic gustatory and lingual areas in the monkey, *Macaca fascicularis*. *Journal of Comparative Neurology*, 244, 213-228.

Quinlan, E. M., Olstein, D. H., & Bear, M. F. (1999). Bidirectional, experience-dependent regulation of N-methyl-D-aspartate receptor subunit composition in the rat visual cortex during postnatal development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 12876–12880.

Quinlan, E.M., Lebel, D., Brosh, I., & Barkai, E. (2004). A molecular mechanism for stabilization of learning-induced synaptic modifications. *Neuron*, 41, 185-192.

Quirk, G. J., & Mueller, D. (2008). Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology*, 33 (1), 56–72.

Rescorla, R. A. (2001). Retraining of extinguished Pavlovian stimuli. *Journal of Experimental Psychology. Animal Behavior Processes*, 27(2), 115–124.

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.

Riedel, G. (1999). If phosphatases go up, memory goes down. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55, 549–553.

Riout-Pedotti, M.S., Friedman, D., & Donoghue, J.P. (2000). Learning-induced LTP in neocortex. *Science*, 290, 533-536.

Riout-Pedotti, M.S., Friedman, D., Hess, G., & Donoghue, J.P. (1998). Strengthening of horizontal cortical connections following skill learning. *Nature Neuroscience*, 1, 230-234.

Rivera-Olvera, A., Rodríguez-Durán, L. F., & Escobar, M. L. (2016). Conditioned taste aversion prevents the long-lasting BDNF-induced enhancement of synaptic

transmission in the insular cortex: A metaplastic effect. *Neurobiology of Learning and Memory*, 130, 71–76.

Roberts, A.C., & Glanzman, D.L. (2003). Learning in *Aplysia*: looking at synaptic plasticity from both sides. *Trends in Neuroscience*, 26, 662-670.

Rodríguez-Durán, L. F., & Escobar, M. L. (2014). NMDA receptor activation and PKC but not PKA lead to the modification of the long-term potentiation in the insular cortex induced by conditioned taste aversion: Differential role of kinases in metaplasticity. *Behavioural Brain Research*, 266, 58–62.

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, 519–526.

Rodríguez-Durán, L. F., Martínez-Moreno, A., & Escobar, M. L. (2017). Bidirectional modulation of taste aversion extinction by insular cortex LTP and LTD. *Neurobiology of Learning and Memory*, 142, 85-90.

Rodríguez-Serrano, L. M., Ramírez-León, B., Rodríguez-Durán, L. F., & Escobar, M. L. (2014). Acute infusion of brain-derived neurotrophic factor in the insular cortex promotes conditioned taste aversion extinction. *Neurobiology of Learning and Memory*, 116, 139-144.

Rogan, M. T., Leon, K. S., Perez, D. L., & Kandel, E. R. (2005). Distinct neural signatures for safety and danger in the amygdala and striatum of the mouse. *Neuron*, 46(2), 309-320.

Rogan, M.T., Staubli, U.V., & Ledoux, J.E. (1997). Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature*, 390, 604-607.

Rogerson, T., Cai, D. J., Frank, A., Sano, Y., Shobe, J., Lopez-Aranda, M. F., & Silva, A. J. (2014). Synaptic tagging during memory allocation. *Nature Review Neuroscience*, 15(3), 157-69.

Ruan, H., Saur, T., & Yao, W. D. (2014). Dopamine-enabled anti-Hebbian timing-dependent plasticity in prefrontal circuitry. *Frontiers in Neural Circuits* 23(8), 38.

Sanhueza, M., & Lisman, J. (2013). The CaMKII/NMDAR complex as a molecular memory. *Molecular Brain*, 6(10), 1-8.

Santini, E., Muller, R. U., & Quirk, G. J. (2001). Consolidation of extinction learning involves transfer from NMDA-independent to NMDA-dependent memory. *The Journal of Neuroscience*, 21(22), 9009-9017.

Santini, E., Sepulveda-Orengo, M., & Porter, J. T. (2012). Muscarinic receptors modulate the intrinsic excitability of infralimbic neurons and consolidation of fear extinction. *Neuropsychopharmacology*, 37 (9), 2047–2056.

Schroeder, B.W., & Shinnick-Gallagher, P. (2005). Fear learning induces persistent facilitation of amygdala synaptic transmission. *European Journal of Neuroscience* 22, 1775-1783.

Shen, H., & Kalivas, P. W. (2013). Reduced LTP and LTD in prefrontal cortex synapses in the nucleus accumbens after heroin self-administration. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 16(5), 1165-7.

Sheynikhovich, D., Otani, S. & Arleo A. (2013). Dopaminergic control of long-term depression/long-term potentiation threshold in prefrontal cortex. *The Journal of Neuroscience*, 3(34), 13914-13926.

Shi, J., Townsend, M., & Constantine-Paton, M. (2000). Activity-Dependent Induction of Tonic Calcineurin Activity Mediates a Rapid Developmental Down-regulation of NMDA Receptor Currents. *Neuron*, 28(1), 103-114.

Shipton, O. A., & Paulsen, O. (2014). GluN2A and GluN2B subunit-containing NMDA receptors in hippocampal plasticity. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 369, 20130163.

Silva, A. J., Zhou, Y., Rogerson, T., Shobe, J., & Balaji, J. (2009). Molecular and cellular approaches to memory allocation in neural circuits. *Science*, 236 (5951), 391-395.

Smith, G. B., Heynen, A. J., & Bear, M. F. (2009). Bidirectional synaptic mechanisms of ocular dominance plasticity in visual cortex. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 364, 357-367.

Snyder, E. M., Nong, Y., Almeida, C. G., Paul, S., Moran, T., Choi, E. Y., Angus, C. N., Michael, W. S., Paul, J. L., Gunnar, K. G., & Paul, G. (2005). Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid- β . *Nature Neuroscience*, 8, 1051–1058.

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).

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 Medica Okayama*, 62, 21-28.

Tong, G., Shepherd, D., & Jahr, C. E. (1995). Synaptic desensitization of NMDA receptors by calcineurin. *Science*, 267(5203), 1510-1512.

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. *Annual Review of Neuroscience*, 34, 89-103.

Turrigiano, G. G., & Nelson, S. B. (2000). Hebb and homeostasis in neuronal plasticity. *Current opinion in neurobiology* 10, 358-364.

Turrigiano, G. G., & Nelson, S.B. (2004). Homeostatic plasticity in the developing nervous system. *Nature Review Neuroscience*, 5, 97-107.

Turrigiano, G. G., Leslie, K. R., Desai, N. S., Rutherford, L. C., & Nelson, S. B. (1998). Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature*, 391, 892-6.

Turrigiano, G.G. (2008). The self-tuning neuron: synaptic scaling of excitatory synapses. *Cell*, 135, 422-435.

Vitureira, N., & Goda, Y. (2013). Cell biology in neuroscience: The interplay between Hebbian and homeostatic synaptic plasticity. *The Journal of Cell Biology*, 203(2), 175–186.

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

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. *Behavioral Pharmacology*, 5, 306-314.

Wells, D.G., & Fallon, J.R. (2000). In search of molecular memory: experience-driven protein synthesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 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.

Winder, D. G., Mansuy, I. M., Osman, M., Moallem, T. M., & Kandel, E. R. (1998). Genetic and pharmacological evidence for a novel, intermediate phase of long-term potentiation suppressed by calcineurin. *Cell*, 92(1), 25-37.

Xu, J., Antion, M. D., Nomura, T., Kraniotis, S., Zhu, Y., & Contractor, A. (2014). Hippocampal Metaplasticity Is Required for the Formation of Temporal Associative Memories. *The Journal of Neuroscience*, 34(50), 16762–16773.

Xu, T., Yu, X., Perlik, A. J., Tobin, W. F., Zweig, J. A., Tennant, K., Jones, T., & Zuo, Y. (2009). Rapid formation and selective stabilization of synapses for enduring motor memories. *Nature*, 462, 915–919.

Yamamoto, T., Matsuo, R., Kiyomitsu, Y., & Kitamura, R. (1989). Taste responses of cortical neurons in freely ingesting rats. *Journal of Neurophysiology*, 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, G., Pan, F., & Gan, W. B. (2009). Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories. *Nature*, 462, 920–924.

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. *Journal of Neurophysiology*, 91, 1122-1133.

Yarmolinsky, D. A., Zuker C. S., & Ryba N. J. (2009). Common sense about taste: from mammals to insects. *Cell*, 139(2), 234-44.

Yashiro, K., & Philpot, B. D. (2008). Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity. *Neuropharmacology*, 55(7), 1081-94.

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 Research*, 869, 15-24.

Yoshida, H., Tomita, H., Sugano, E., Isago, H., Ishiguro, S., & Tamai, M. (2008). BDNF increases the phagocytic activity in cultured iris pigment epithelial cells. *Cell Structure and Function*, 33(1), 21-6.

Zhang, L., Kirschstein, T., Sommersberg, B., Merkens, M., Manahan-Vaughan, D., Elgersma, Y., & Beck, H. (2005). Hippocampal synaptic metaplasticity requires inhibitory autophosphorylation of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II. *The Journal of Neuroscience*, 25(33), 7697-707.

Zhou, Q., & Poo, M.-M. (2004). Reversal and consolidation of activity-induced synaptic modifications. *Trends in Neuroscience*, 27, 378–383.

Zhou, Y., Won, J., Karlsson, M. G., Zhou, M, Rogerson, T., Balaji, J., Neve, R., Poirazi, P., & Silva, A. J. (2009). CREB regulates excitability and the allocation of memory to subsets of neurons in the amygdala. *Nature Neuroscience*, 12(11), 1438-43.

XI. ANEXO

El anexo corresponde al artículo que conjunta los principales hallazgos del proyecto de investigación que se presentan en esta tesis, el cual fue enviado para su publicación. Específicamente muestra que la extinción del CAS previene el mantenimiento de la LTP en la vía BLA-CI, además de incrementar la expresión de CaN en la CI.

**EXTINCTION OF AVERSIVE TASTE MEMORY HOMEOSTATICALLY PREVENTS THE
MAINTENANCE OF IN VIVO INSULAR CORTEX LTP**

Alejandro Rivera-Olvera¹, Janikua Nelson-Mora², María E. Gonsebatt² and
Martha L. Escobar¹

1. División de Investigación y Estudios de Posgrado, Facultad de Psicología,
Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México
2. Departamento de Medicina Genómica, Instituto de Investigaciones Biomédicas,
Universidad Nacional Autónoma de México, México

Number of pages (including references and figures captions): 21

Number of figures: 3

Correspondence to:

Dr. Martha L. Escobar

División de Investigación y Estudios de Posgrado

Facultad de Psicología

Universidad Nacional Autónoma de México

C.P. 04510 México, D.F.

México

Phone (52) (55) 56222222 ext. 41227

FAX (52) (55) 56222310

E-mail: mescobar@unam.mx

ABSTRACT

Accumulating evidence indicates that homeostatic plasticity mechanisms dynamically adjust synaptic strength to promote stability that is crucial for memory storage. Our previous studies have shown that prior training in conditioned taste aversion (CTA) prevents the subsequent induction of long-term potentiation (LTP) in the projection from the basolateral nucleus of the amygdala (BLA) to the insular cortex (IC) in vivo. We have also reported that induction of LTP in the BLA-IC pathway modifies the CTA extinction. Memory extinction involves the formation of a new associative memory that inhibits a previously conditioned association. The aim of the present study was to analyze the effect of CTA extinction on the ability to induce subsequent LTP in the BLA-IC projection in vivo. Thus, 48 h after CTA extinction animals received high frequency stimulation in order to induce IC-LTP. Our results show that extinction training allows the induction but not the maintenance of IC-LTP. In addition, with the purpose of exploring part of the mechanisms involved in this process and since a body of evidence suggests that protein phosphatase calcineurin (CaN) is involved in the extinction of some behavioral tasks, we analyzed the participation of this phosphatase. The present results show that extinction training increases the CaN expression in the IC. These findings reveal that CTA extinction promotes a homeostatic regulation of subsequent IC synaptic plasticity maintenance probably through increases in CaN levels.

Keywords: Metaplasticity, CTA, Extinction, LTP, Insular Cortex.

1. INTRODUCTION

Nowadays it is widely considered that learning and memory are supported by cellular mechanisms that generate changes in connectivity within the neural circuits. Specific

neuronal activity patterns lead to durable increases or decreases in the strength of synaptic connections, termed long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD) respectively (Citri & Malenka, 2008; Vitureira & Goda, 2013). Nevertheless, stable but flexible neural activity is critical for proper brain function. In this context, it has been proposed that homeostatic plasticity contributes to the overall regulation of synaptic strength by maintaining it within a dynamic functional range (Müller-Dahlhaus & Ziemann, 2015). Metaplasticity, the process in which the activity history of a given neural network shapes the direction, duration and magnitude of future synaptic changes, is ideally suited to prepare neuronal networks for encoding specific information, thereby ensuring subsequent learning and long-lasting memory storage (Hulme, Jones, & Abraham, 2013; Schmidt, Abraham, Maroun, Stork, & Richter-Levin, 2013; Hager et al., 2015; McHail & Dumas, 2015; Müller-Dahlhaus & Ziemann, 2015; Li et al., 2017).

In this regard, it has been demonstrated that previous acquisition of aversive learning can modify the ability to express subsequent LTP in both the hippocampus (Hirata et al., 2009, Xu et al., 2014) and neocortex (Rodríguez -Durán, Castillo, Moguel-González, & Escobar, 2011; Rodríguez-Durán & Escobar, 2014; Rivera-Olvera, Rodríguez-Durán, & Escobar, 2016). The insular cortex (IC) is a region of the brain that lies in the temporal neocortex and is known for its role in processing aversively motivated learning tasks, like conditioned taste aversion (CTA) (Elkobi, Ehrlich, Belelovsky, Barki-Harrington, & Rosenblum, 2008; Adaikkan & Rosenblum, 2015; Li et al., 2016), a form of associative learning where the subject associates a novel taste with a subsequent transient visceral illness (Bermúdez-Rattoni, 2014; Welzl, D'Adamo, & Lipp, 2001). After the establishment of an association between the two stimuli, the conditioned response will decrease if the taste is presented in the absence of noxious stimulus and this phenomenon is called extinction (Maren, 2011;

Maroun, Kavushansky, Holmes, Wellman, & Motanis, 2012; Hadamitzky et al., 2016; Rodríguez-Durán, Martínez-Moreno, & Escobar, 2017).

Currently it is widely accepted that memory extinction involves the formation of a new associative memory that inhibits a previously conditioned association rather than unlearning of acquisition (Bouton, 2004; Maren, 2011; Maroun et al., 2012). Regarding the mechanisms, it has been demonstrated that fear training induces the phosphorylation of specific protein substrates such as phosphatidylinositol 3-kinase (PI-3K) while extinction is accompanied by an increase in the activation of calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase, calcineurin (CaN) (Lin et al., 2003b). Likewise, it has been reported that CaN is involved in the induction of LTD in the hippocampal CA1 region (Mulkey, Endo, Shenolikar & Malenka, 1994), as well as that its inhibition blocks the generation of LTP in the rat visual cortex (Funauchi, Haruta, & Tsumoto, 1994).

Our previous studies showed that CTA training modifies the ability to induce subsequent Bla-IC LTP generated either by high frequency stimulation (HFS) (Rodríguez-Durán et al., 2011; Rodríguez-Durán & Escobar, 2014) or by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Rivera-Olvera et al., 2016). Additionally, we reported that induction of LTP in the Bla-IC projection previous to CTA training increases the retention of this task (Escobar & Bermúdez-Rattoni, 2000), while LTD induction facilitates its extinction (Rodríguez-Durán et al., 2017). However, whether CTA extinction modifies the induction of subsequent synaptic plasticity in the IC has not yet been addressed. In the present study, we explored the effect of CTA extinction training on the ability to induce subsequent in vivo LTP in the BLA-IC projection as well as the potential participation of CaN in this process.

2. METHODS

2.1. *Animals*

Seventy-three male Wistar rats weighting 350–380g were used for the present study. All rats were caged individually and kept on a 12:12 light–dark cycle at 22°C with food and water available *ad libitum* except for experimental phases as noted below. Experiments were performed in accordance with the Norma Oficial Mexicana and with the approval of the Animal Care Committee of the Faculty of Psychology of the National Autonomous University of Mexico.

2.2. *Conditioned taste aversion*

Animals were placed on a water deprivation schedule, allowing access to water twice a day from a graduated cylinder. Water intake during 10 min drinking interval was recorded for each rat in the course of 3 days. On the day of conditioning, rats were allowed to drink saccharin solution 0.1% (Sigma, St. Louis, MO) instead of water, and 10 min later, rats were injected i. p. with LiCl (0.15 M; 7.5 ml/kg) to induce gastric malaise. After three more days of baseline consumption, saccharin solution was presented again to test the aversion. The reduction of saccharin consumption was used as a measure of the strength of aversion. During the extinction phase, nine extinction trials (one every other day over the course of eighteen days) were given to the groups indicated below.

2.3. *Electrophysiological procedures*

Animals were anesthetized with pentobarbital (50 mg/kg i.p.) and given supplemental injections at 1-h intervals. Body temperature was maintained at 35 °C with a heating pad. IC

responses were recorded unilaterally by using a monopolar stainless-steel electrode. Constant current stimulation (300–600 μ A monophasic pulses, 0.25 ms duration) was provided via direct and unilateral stimulation of the Bla by using a stainless steel bipolar electrode (Fig 1). Animals with unclear electrode placement were discarded. IC evoked responses were measured by obtaining the field excitatory postsynaptic potential (EPSP) slope measured 1–3 ms after the EPSP onset. During the 20 min baseline period responses were evoked at 0.05 Hz. 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 two hours. 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.

2.4 Experimental design

To examine the effect of CTA extinction on the subsequent induction of IC-LTP, animals were distributed into the following treatment groups: (1) HFS group (n = 10) which received HFS capable of inducing IC-LTP; (2) CTA + HFS group (n = 10) which was trained in the CTA task and 48 h after the aversion test received HFS capable of inducing LTP; (3) EXT + HFS group (n = 15), which was trained in the CTA task including the extinction phase and 48 h after the last extinction trial received HFS to induce LTP; (4) pCTA (UCS) + HFS group (n = 10), in which HFS was applied 48 h after pseudo-training in the CTA task, in this group LiCl was replaced by phosphate-buffered saline (PBS) during the acquisition session; (5) pCTA (CS) + HFS group (n = 10), in which HFS was applied 48 h after pseudo-training in the CTA task, this group received LiCl in the absence of conditioned stimulus (saccharin solution) during the CTA acquisition session. For all groups, the evoked responses were collected for 2 h after HFS application. I/O curves were assessed for baseline synaptic

responses in the Bla-IC pathway using multiples of threshold intensity (1-10X), either 48 h after the aversion test (for groups trained or pseudotrained in CTA) or after the last extinction trial for group EXT + HFS. The stimulation intensity required to produce a response amplitude of 0.10 mV, was defined as the threshold intensity.

2.5. *Western blot procedure*

In order to analyze the phosphorylated state of a downstream target of PI-3K cascade protein kinase B (Akt), a signaling pathway associated with acquisition of fear learning and generation of LTP (Barros et al., 2001; Lin et al. 2001; Horwood, Dufour, Laroche, & Davis 2006), as well as the expression of protein phosphatase calcineurin, eighteen additional animals were used to perform Western blot assays. Animals were divided into the following groups: CTA (n=6), in which animals were trained in the CTA task and the IC was microdissected, 48 h after the aversion test; EXT group (n=6), in which animals were trained in CTA, including the extinction phase and the IC was microdissected 48 h after the last extinction trial; and intact (INT) group (n=6), consisting of animals in which the Western blot assay was performed without previous training. Bilateral IC of each animal was lysated in ice-cold lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1mM Na₂EDTA, 1mM EGTA, 1% Triton, 2.5 mM NaPPi, 1mM β-glycerophosphate, 1 mM Na₃VO₄, 1 μg/ml leupeptin) supplemented with 10 mM protease inhibitors (Mini Complete, Roche, Mannheim, Germany). Samples of the 6 animals of each group were pooled, performing three independent assays for each pool during the Western blot analysis. Following, the samples were centrifuged at 8000g for 30 min at 4 °C, and the supernatant was recovered. Protein concentration was measured using Bradford assay, with bovine serum albumin as standard. Aliquots containing 50 μg protein each were separated by SDS-PAGE gel electrophoresis using 10%

polyacrylamide. Each gel was then transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad, California, USA). After that, membranes were blocked overnight at 4° C in TBS containing 5% nonfat milk and 0.1% Tween 20 (TBS-Tween). After washing the membrane three times with TBS-Tween, primary antibodies against β -actin (horseradish peroxidase (HRP) conjugate) (1:20000, #13E5, Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA), calcineurin (1:5000, #610259, BD Biosciences, New Jersey, USA), p-Akt (Thr 308) (1:1500, #9275, Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA) or Akt (1:2000, #9272 Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA) were applied and incubated at room temperature for 1 h.

The blots were probed with anti- β -actin-HRP conjugate or anti-Akt after stripping, which were used as loading controls. The protein bands were visualized with appropriated HRP-linked secondary antibodies using the ECL Prime Western blotting detection reagent (GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA); images were captured and densitometric analysis was performed with Image J software version 1.46r software (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

3. RESULTS

Stimulating and recording electrodes were correctly located in the Bla and IC respectively for all groups (Fig. 1) as revealed by histological examinations. Animals with unclear electrode placement were excluded from the analysis.

The IC field EPSP consisted of 0.37 ± 0.05 mV (mean \pm S.E.M.) potentials elicited with 300–600 μ A current intensities and displayed an onset at 2–3 ms and a peak at approximately 7–9 ms, with an average slope of 0.088 ± 0.003 (mean \pm S.E.M.), in agreement with previous studies (Rivera-Olvera et al., 2016; Rodríguez-Durán et al., 2017).

3.1. CTA

Water intake during the acquisition session did not differ among groups. The average baseline means (\pm S. E. M.) of water intake were (in ml) 18.25 ± 0.36 , 18.20 ± 0.63 , 20.45 ± 0.08 and 17.87 ± 0.36 for EXT+HFS, CTA+HFS, pCTA(CS)+HFS and pCTA(UCS)+HFS group, respectively. However, during the aversion test ANOVA for saccharin consumption revealed significant differences among groups ($F_{3,41} = 169.90$, $p < 0.001$). Post-hoc analysis with Fisher's test, showed specific differences between trained and pseudo-trained groups ($p < 0.001$, Fig. 2A).

3.2. Extinction of CTA prevents the maintenance of LTP in the IC in vivo

The present results show that extinction of CTA allows the induction but not the maintenance of subsequent LTP in the Bla-IC projection 48 h after the last extinction trial, whereas animals that only were trained in CTA did not present IC-LTP 48 h after the aversion test, in agreement with previous studies (Rodríguez-Durán et al., 2011; Rodríguez-Durán et al., 2014; Rivera-Olvera et al., 2016). Animals from groups HFS, pCTA(UCS)+HFS and pCTA(CS)+HFS exhibited IC-LTP (Fig. 2B), demonstrating that the association between CS and UCS is necessary to produce the homeostatic regulation of synaptic strength in the IC. Repeated-measures ANOVA analysis for immediately after tetanus slope increases revealed significant group differences ($F_{4,50} = 42.56$). Post-hoc analysis with Fisher's test, showed that CTA+HFS group presents significant differences with the rest of groups ($p < 0.001$). Groups HFS, pCTA(UCS)+HFS, pCTA(CS)+HFS and EXT+HFS were not statistically different from each other, showing that extinction of CTA allows the induction of in vivo IC-LTP. Nonetheless, statistical analysis for the last 20 m of recordings revealed

significant group differences ($F_{4,50} = 55.61$). Post-hoc analysis showed that EXT+HFS group was statistically different from HFS, pCTA(UCS)+HFS and pCTA(CS)+HFS groups ($p < 0.001$) but not from CTA+HFS group, showing that extinction does not allow the maintenance of subsequent LTP. These results are in agreement with studies reporting that extinction does not degrade the original memory-trace, but instead generates new learning (Maren, 2011; Maroun et al., 2012).

3.3. I/O relationship

Non-linear regression analysis of I/O relationship, revealed significant differences between the CTA and pseudotrained groups ($p < 0.001$), in agreement with our previous results (Rivera-Olvera et al., 2016; Rodríguez-Durán et al., 2017). Interestingly, I/O curve from EXT+HFS group exhibits significant differences compared to CTA and pseudotrained groups ($p < 0.001$) (Fig. 2C). These data indicate that the extinction process reverts the increases in synaptic efficacy of the Bla-IC pathway elicited by CTA training.

3.4. CTA-extinction increases the CaN expression in the insular cortex

It has been demonstrated that fear conditioning induces phosphorylation of specific substrates such as PI-3K in the amygdala of trained animals (Lin, Lee, & Gean, 2003a; Lin et al., 2003b). However, these changes decrease after extinction training and are accompanied by an increase in the protein levels and enzymatic activity of CaN (Lin et al., 2003a; Lin et al., 2003b). Thus, with the purpose of exploring part of the mechanisms involved in the homeostatic regulation of IC-LTP due to CT extinction we assessed by

Western blotting the phosphorylated state of a downstream target of PI-3K cascade (Akt) and the expression of protein phosphatase CaN.

Western blot analysis showed that CTA-extinction increases the CaN expression in the IC. As shown in Fig. 3A, 48 h after the ninth extinction trial the IC showed a significant increase in CaN levels, as compared to CTA and INT groups (one-way ANOVA analysis; $F_{2,6} = 14.38$; $p < 0.001$). On the other hand, group CTA exhibited a significant increase in p-Akt levels compared to groups EXT and INT (Fig. 3B). Nevertheless, significant differences were observed between the latter two groups. One-way ANOVA analysis revealed significant differences among groups ($F_{2,6} = 48.74$; $p < 0.001$). These results suggest that memory trace generated by extinction of CTA might be regulated by CaN expression in the IC.

4. DISCUSSION

Metaplasticity contributes to the regulation of synaptic plasticity that is critical for healthy cognition and learning (Singh & Abraham, 2017). Hence, both LTD and LTP thresholds can be modified in a metaplastic manner, changing the ability to induce further synaptic plasticity (Yashiro & Philpot, 2008). In the present study, we show that extinction of CTA allows the induction but not the maintenance of subsequent IC-LTP, 48 h after the last extinction session.

In previous studies we showed that CTA training modifies the ability to induce subsequent Bla-IC-LTP generated by either BDNF administration or HFS (Rivera-Olvera et al., 2016; Rodríguez-Durán & Escobar, 2014). Our present results show that CTA-extinction prevents

the maintenance of subsequent IC-LTP. In this line of ideas, substantial evidence suggests that extinction creates a new memory and consolidation of this process requires synaptic plasticity (Bouton, 2004; Li et al., 2016; Maroun et al., 2012; Mauk & Ohyama, 2004; Rescorla, 2001; Rodríguez-Serrano, Ramírez-León, Rodríguez-Durán, & Escobar, 2014). In this regard, using in vivo optical imaging, Accola and Carleton showed that inducing CTA to a sweet and pleasant stimulus induced plastic rearrangement of its IC representation, becoming more similar to a bitter and unpleasant taste representation. Interestingly, CTA extinction reshaped the IC representation of the stimulus turning it back to a pleasant one (Accola & Carleton, 2008). Thus, CTA extinction can be considered as a new learning that interferes with, or overrides, the original conditioned-unconditioned stimulus association, modifying the thresholds for the induction of subsequent synaptic plasticity.

In a recent study from our group it was observed that induction of LTD in the Bla-IC projection before CTA training facilitates the extinction of this task. Conversely, prior LTP induction enhances CTA retention, suggesting a bidirectional modulation of CTA extinction in response to IC-LTP or LTD and providing evidence of the homeostatic adaptation of taste learning (Rodríguez-Durán et al., 2017). In accordance with the above, several studies have emerged in support of a mechanism consistent with an unlearning account of extinction, in which plasticity underlying memory is reversed through a synaptic depotentiation (i.e., a return of potentiated synapses to baseline) (Myers, Ressler, & Davis, 2006; Kim et al., 2007; Dalton, Wang, Floresco & Phillips, 2008; Hong et al., 2009; Li et al., 2016). Likewise, Rogan and collaborators demonstrated that fear conditioning increases the tone-evoked responses of lateral amygdala neurons of awake, behaving mice, nonetheless, these responses were depotentiated when the tone was trained as a safety signal (Rogan, Leon, Perez, & Kandel, 2005). The above suggest that learning-induced LTP may be reversed during extinction

training through neural processes related to LTD (or depotentiation) of synaptic strengths. Moreover, in a recently study carried out by Li and collaborators it was reported that extinction of CTA led to the reduced insular synaptic efficacy, supporting a functional link between IC-LTD and CTA extinction (Li et al., 2016). In agreement with the above, in the present study analysis of I/O curves reveals that CTA training increases the synaptic efficacy of the Bla-IC projection, while extinction reverses this strengthening. However, it still maintains differences with pseudotrained and naive groups. These data suggest that the CTA process of extinction itself is able to change the basal state of the Bla-IC pathway generated by the aversion memory. Decreased basal excitability of this pathway might leads to a change in the threshold for the generation of subsequent synaptic plasticity.

Multiple evidences indicate that the biochemical and molecular mechanisms of depotentiation are opposite to those of LTP, suggesting a specific role of kinases and phosphatases in the bidirectional control of synaptic strength (Pi, & Lisman, 2008; Lisman, 1994). Thus, LTP is associated with phosphorylation of several substrates including calcium/calmodulin dependent protein kinase II (CaMKII), Akt, and mitogen-activated protein kinase (MAPK), down-regulation of phosphatase activity, as well as phosphorylation and membrane insertion of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors (Riedel, 1999; Malinow, & Malenka 2002; Waltereit, & Weller 2003). In contrast, depotentiation is associated with dephosphorylation of Akt, MAPK, and CaMKII; up-regulation of protein phosphatases including CaN and protein phosphatase 1 (PP1); and dephosphorylation and internalization of AMPA receptors (Zhou, & Poo 2004; Lin, Yeh, Lu, & Gean 2003c). Thus, whereas LTP-inducing HFS engages second messenger cascades culminating in gene transcription and protein synthesis, depotentiation-inducing LFS counteracts those effects at every level (Myers et al., 2006). In agreement with this, our

present study shows that CTA extinction increases the CaN expression 48 h after the last extinction trial and decreases the phosphorylation of Akt (Th308) in the IC, suggesting a down-regulation of the IC synaptic efficiency as a metaplastic modulation of the memory trace previously generated by CTA training.

In summary, our present results show that CTA extinction homeostatically regulates the subsequent response of the Bla-IC pathway probably through decreasing basal transmission and increasing CaN levels in the cortical circuit.

ACKNOWLEDGEMENTS: This research was supported by PAPIIT IN-215816 and CONACYT 474. We thank Dr. Andrés Nieto Posadas for careful reading of the article.

5. REFERENCES

Accolla, R., & Carleton, A. (2008). Internal body state influences topographical plasticity of sensory representations in the rat gustatory cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(10), 4010-4015.

Adaikkan, C., & Rosenblum, K. (2015). A molecular mechanism underlying gustatory memory trace for an association in the insular cortex. *eLife*, 4, e07582.

Barros, D. M., Mello e Souza, T., de Souza, M. M., Choi, H., DeDavid e Silva, T., Lenz, G., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2001). LY294002, an inhibitor of phosphoinositide 3-kinase given into rat hippocampus impairs acquisition, consolidation and retrieval of memory for one-trial step-down inhibitory avoidance.

Bermúdez-Rattoni, F. (2014). The forgotten insular cortex: Its role on recognition memory formation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 109C, 207–216.

Bouton, M. E. (2004). Context and behavioral processes in extinction. *Learning & Memory*, 11(5), 485–494.

Citri, A., & Malenka, R. C. (2008). Synaptic plasticity: Multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, 33(1), 18–41.

Dalton, G. L., Wang, Y. T., Floresco, S. B., & Phillips, A. G. (2008). Disruption of AMPA receptor endocytosis impairs the extinction, but not acquisition of learned fear. *Neuropsychopharmacology*, 33(10), 2416-2426.

Elkobi, A., Ehrlich, I., Belevsky, K., Barki-Harrington, L., & Rosenblum, K. (2008). ERK-dependent PSD-95 induction in the gustatory cortex is necessary for taste learning, but not retrieval. *Nature Neuroscience*, 11(10), 1149-1151.

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

Funauchi, M., Haruta, H., & Tsumoto, T. (1994). Effects of an inhibitor for calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase, calcineurin, on induction of long-term potentiation in rat visual cortex. *Neuroscience Research*, 19(3), 269-278.

Hadamitzky, M., Bösch, K., Wirth, T., Buck, B., Beetz, O., Christians, U., Schniedewind, B., Lückemann, L., Güntürkün, O., Engler, H., & Schedlowski, M. (2016). Memory-updating abrogates extinction of learned immunosuppression. *Brain, Behavior, and Immunity*, 52, 40–48.

Hager, A. M., Gagolewicz, P. J., Rodier, S., Kuo, M.-C., Dumont, É. C., & Dringenberg, H. C. (2015). Metaplastic up-regulation of LTP in the rat visual cortex by monocular visual training: Requirement of task mastery, hemispheric specificity, and NMDA-GluN2B involvement. *Neuroscience*, 293, 171–186.

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., Song, B., Lee, S., Kim, J., Kim, J., & Choi, S. (2009). Extinction of cued fear memory involves a distinct form of depotentiation at cortical input synapses onto the lateral amygdala. *European Journal of Neuroscience*, 30, 2089-2099.

Horwood, J.M., Dufour, F., Laroche, S., & Davis, S. (2006) Signaling mechanisms mediated by the PI3K/Akt cascades in synaptic plasticity and memory in rats. *J Neurosci*, 23, 3375-3384.

Hulme, S. R., Jones, O. D., & Abraham, W. C. (2013). Emerging roles of metaplasticity in behaviour and disease. *Trends in Neurosciences*, 36, 353–362.

Kim, J., Lee, S., Park, K., Hong, I., Song, B., Son, G., Park, H., Kim, W. R., Park, E., Choe, H. K., Kim, H., Lee, C., Sun, W., Kim, K., Shin, K. S., Choi, S. (2007). Amygdala depotentiation and fear extinction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(52), 20955-20960.

Li, Q., Navakkode, S., Rothkegel, M., Soong, T. W., Sajikumar, S., & Korte, M. (2017). Metaplasticity mechanisms restore plasticity and associativity in an animal model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(21), 5527-5532.

Li, W.-G., Liu, M.-G., Deng, S., Liu, Y.-M., Shang, L., Ding, J., Hsu, T.-T., Jiang, Q., Li, Y., Li, F., Zhu, M. X., & Xuc, T.-L. (2016). ASIC1a regulates insular long-term depression and is required for the extinction of conditioned taste aversion. *Nature Communications*, 7, 13770.

Lin, C. H., Lee, C. C., & Gean, P. W. (2003a). Involvement of a calcineurin cascade in amygdala depotentiation and quenching of fear memory. *Molecular Pharmacology*, 63(1), 44-52.

Lin, C. H., Yeh, S. H., Leu, T. H., Chang, W. C., Wang, S. T., & Gean, P. W. (2003b) Identification of calcineurin as a key signal in the extinction of fear memory. *Journal of Neuroscience*, 23, 1574–1579.

Lin, C. H., Yeh, S. H., Lin, C. H., Lu, K. T., Leu, T. H., Chang, W. C., & Gean, P. W. (2001). A role for the PI-3 kinase signaling pathway in fear conditioning and synaptic plasticity in the amygdala. *Neuron*, 31(5), 841-851.

Lin, C. H., Yeh, S. H., Lu, H. Y., & Gean, P. W. (2003c). The Similarities and Diversities of Signal Pathways Leading to Consolidation of Conditioning and Consolidation of Extinction of Fear Memory. *Journal of Neuroscience*, 23(23), 8310-8317.

Lisman, J. (1994) The CaM kinase II hypothesis for the storage of synaptic memory. *Trends in Neurosciences*, 17, 406–412.

Malinow, R., & Malenka, R. C. (2002). AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annual Review of Neuroscience*, 25, 103–126.

Maren, S. (2011). Seeking a spotless mind: extinction, deconsolidation, and erasure of fear memory. *Neuron*, 70(5), 830-845.

Maroun, M., Kavushansky, A., Holmes, A., Wellman, C., & Motanis, H. (2012). Enhanced extinction of aversive memories by high-frequency stimulation of the rat infralimbic cortex. *PLoS ONE*, 7(5), e35853.

McHail, D. G., & Dumas, T. C. (2015). Multiple forms of metaplasticity at a single hippocampal synapse during late postnatal development. *Developmental Cognitive Neuroscience*, 12, 145–154.

Mulkey, R. M., Endo, S., Shenolikar, S., & Malenka, R. C. (1994). Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. *Nature*, 369(6480), 486-488.

Müller-Dahlhaus, F., & Ziemann, U. (2015). Metaplasticity in human cortex. *Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 21, 185–202.

Myers, k. M., Ressler, K., J., & Davis, M. (2006). Different mechanisms of fear extinction dependent on length of time since fear acquisition. *Learning & Memory*, 13(2), 216–223.

Pi, H. J., & Lisman, J. E. (2008). Coupled phosphatase and kinase switches produce the tristability required for LTP and LTD. *Journal of Neuroscience*, 28(49), 13132-13138.

Rescorla, R. A. (2001). Retraining of extinguished Pavlovian stimuli. *Journal of Experimental Psychology. Animal Behavior Processes*, 27(2), 115–124.

Riedel, G. (1999). If phosphatases go up, memory goes down. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55, 549–553.

Rivera-Olvera, A., Rodríguez-Durán, L. F., & Escobar, M. L. (2016). Conditioned taste aversion prevents the long-lasting BDNF-induced enhancement of synaptic transmission in the insular cortex: A metaplastic effect. *Neurobiology of Learning and Memory*, 130, 71–76.

Rodríguez-Durán, L. F., & Escobar, M. L. (2014). NMDA receptor activation and PKC but not PKA lead to the modification of the long-term potentiation in the insular cortex induced by conditioned taste aversion: Differential role of kinases in metaplasticity. *Behavioural Brain Research*, 266, 58–62.

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, 519–526.

Rodríguez-Durán, L. F., Martínez-Moreno, A., & Escobar, M. L. (2017). Bidirectional modulation of taste aversion extinction by insular cortex LTP and LTD. *Neurobiology of Learning and Memory*, 142, 85-90.

Rodríguez-Serrano, L. M., Ramírez-León, B., Rodríguez-Durán, L. F., & Escobar, M. L. (2014). Acute infusion of brain-derived neurotrophic factor in the insular cortex promotes conditioned taste aversion extinction. *Neurobiology of Learning and Memory*, 116, 139-144.

Rogan, M. T., Leon, K. S., Perez, D. L., & Kandel, E. R. (2005). Distinct neural signatures for safety and danger in the amygdala and striatum of the mouse. *Neuron*, 46(2), 309-320.

Schmidt, M. V., Abraham, W. C., Maroun, M., Stork, O., & Richter-Levin, G. (2013). Stress-induced metaplasticity: From synapses to behavior. *Neuroscience*, 250, 112–120.

Singh, A., & Abraham, W. C. (2017). Astrocytes and synaptic plasticity in health and disease. *Experimental Brain Research*, 235(6), 1645-1655.

Vitureira, N., & Goda, Y. (2013). Cell biology in neuroscience: The interplay between Hebbian and homeostatic synaptic plasticity. *The Journal of Cell Biology*, 203(2), 175–186.

Waltereit, R., & Weller, M. (2003). Signaling from cAMP/PKA to MAPK and synaptic plasticity. *Molecular Neurobiology*, 27, 99–106.

Welzl, H., D'Adamo, P., & Lipp, H. P. (2001). Conditioned taste aversion as a learning and memory paradigm. *Behavioural Brain Research*, 125, 205–213.

Xu, J., Antion, M. D., Nomura, T., Kraniotis, S., Zhu, Y., & Contractor, A. (2014). Hippocampal Metaplasticity Is Required for the Formation of Temporal Associative Memories. *Journal of Neuroscience*, 34(50), 16762–16773.

Yashiro, K., & Philpot, B. D. (2008). Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity. *Neuropharmacology*, 55(7), 1081-1094.

Zhou, Q., & Poo, M.-M. (2004). Reversal and consolidation of activity-induced synaptic modifications. *Trends in Neurosciences*, 27, 378–383.

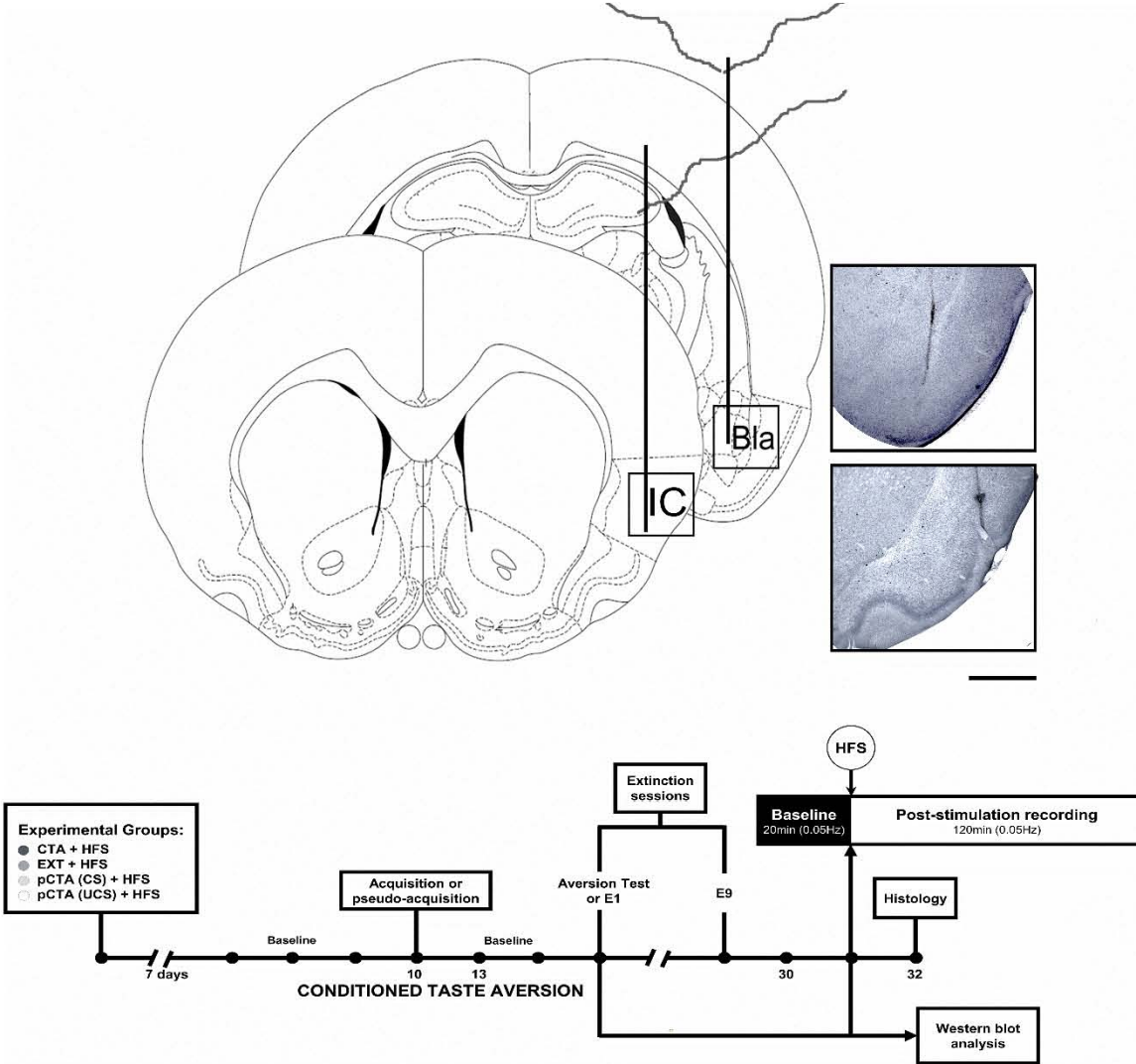
FIGURE CAPTIONS

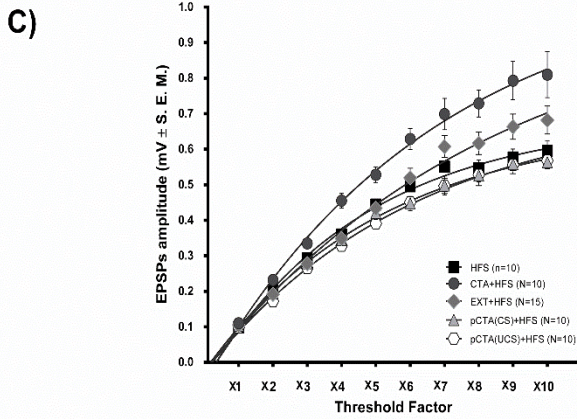
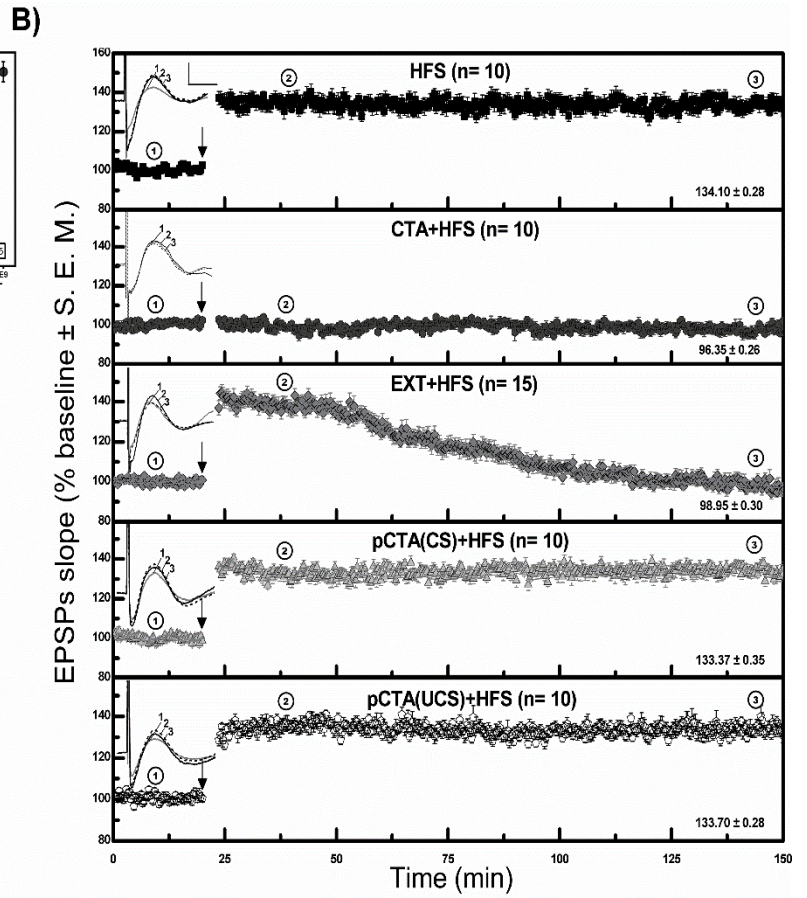
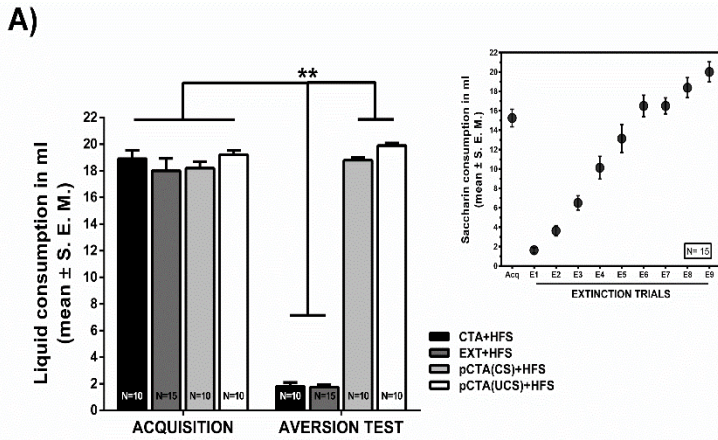
Figure 1. Schematic representation and representative images of electrode placement showing the stimulated (S) and recorded (R) sites in a coronal plane (upper panel). Diagram of the experimental procedure (lower panel). Bla: basolateral amygdaloid nucleus; IC: insular cortex; HFS: high-frequency stimulation. Scale bar: 1 mm.

Figure 2. Extinction of CTA allows the induction but not the maintenance of IC-LTP in vivo and modifies the basal excitability of the insular cortex. A) Liquid consumption during the acquisition session (ACQ) and the aversion test (TEST) for CTA+HFS, EXT+HFS, pCTA(CS)+HFS and pCTA(UCS)+HFS groups. The inset shows the extinction process over the course of nine extinction trials (E1-E9) for group EXT-HFS. **B)** Plot of IC evoked responses from HFS, CTA+HFS, EXT+HFS, pCTA(CS)+HFS and pCTA(UCS)+HFS groups. Note that CTA training blocks LTP induction at the Bla-IC pathway, while animals that experienced CTA extinction show induction but not maintenance of IC-LTP. The top of each graph shows representative IC field potentials obtained immediately before (1: gray line), 20 (2: black line) and 130 (3: dotted line) min after HFS. Arrows indicate HFS delivery. Inner numbers show the average of EPSPs slope (percent of baseline) obtained 139 min after HFS for each group. Scale bar: 10ms, 0.5mV. **C)** Plot of I/O curves for HFS, CTA+HFS, EXT+HFS, pCTA(CS)+HFS and pCTA(UCS)+HFS groups. **p < 0.01.

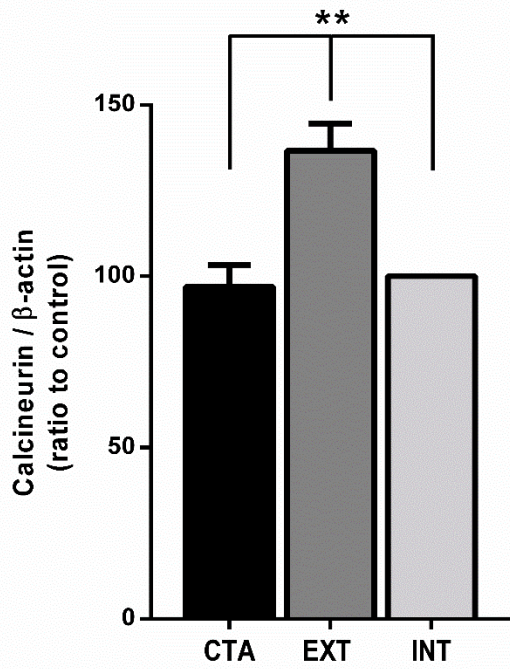
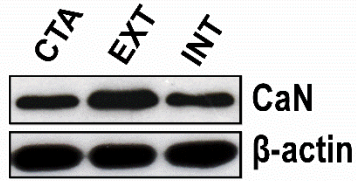
Figure 3. Extinction of CTA increases the CaN expression. Representative Western blots and densitometric analysis of CaN (A) and Akt phosphorylation (B) from CTA, EXT and INT groups. Note that extinction training increases the levels of CaN in the IC as compared

with CTA and INT groups, as well as, decreased phosphorylation of Akt compared to the CTA group without reaching the p-Akt levels of the INT group. ** $p < 0.01$.





A)



B)

