



Universidad Nacional Autónoma de México
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN PSICOLOGÍA

EL BDNF COMO MODULADOR DE LA PLASTICIDAD SINÁPTICA NEO Y PALEOCORTICAL:

MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN EL MANTENIMIENTO DE LA MEMORIA

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORADO EN PSICOLOGÍA**

PRESENTA:

ARACELI MARTÍNEZ MORENO

DIRECTORA:

**DRA. MARTHA LILIA ESCOBAR RODRÍGUEZ
FACULTAD DE PSICOLOGÍA**

COMITÉ:

**DRA. SOFÍA YOLANDA DÍAZ MIRANDA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
DR. JULIO EDUARDO ROQUE MORÁN ANDRADE
INSTITUTO DE FISIOLOGÍA CELULAR
DRA. LIVIA SÁNCHEZ CARRASCO
FACULTAD DE PSICOLOGÍA
DRA. MARÍA ISABEL MIRANDA SAUCEDO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

Cd. Mx.

ENERO, 2019



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.

Dedicatoria

*Dedico este trabajo a mis **padres y abuelos**, quienes forjaron mis cimientos e ímpetu de superación.*

*A mi gran amor y compañero de vida **Javier Vargas**, gracias por confiar siempre en mí y por tu sustento constate en cada paso que doy. Definitivamente la vida sabe mejor a tú lado, **TE AMO**.*

*A mis **hermanos**, por ser un gran ejemplo a seguir desde pequeña, por enseñarme a no rendirme ante nada y el valor de una familia unida.*

*A mi familia extendida **Vargas-Trujillo**, gracias por todo su apoyo y cariño.*

Agradecimientos

Hoy se cierra un ciclo en mi formación como investigadora, y definitivamente no puedo concluirlo sin antes agradecer a todas aquellas personas que estuvieron detrás de este gran esfuerzo que es la culminación de mi proyecto de investigación. Aunque he elegido un camino nada sencillo, las experiencias, conocimientos y recompensas que he tenido son inmensos y estoy segura de que lo seguirán siendo.

Gracias antes que nada a mis padres Juana Moreno y Javier Martínez, por siempre motivar mis ánimos de superación y crecimiento. Gracias a mis abuelos Pedro Moreno†, Melecia Hernández†, Lucio Martínez† y Dolores Lara†, quienes, aunque ya no se encuentran presentes en esta vida, sé que desde donde están siguen cuidando mis pasos. A mis hermanos Gaby, Javier y Arturo, por demostrarme que puedo contar con su apoyo en todo momento y que, aunque estemos lejos sé que van a estar a mi lado cuando los necesite. LOS AMO.

Gracias a mi gran amor, Javier Vargas, porque cada día que pasa tengo la certeza de haber tomado la decisión correcta al unir nuestras vidas, definitivamente somos un gran equipo, hemos crecido mucho juntos y tenemos muchas más metas por cumplir. Gracias por estar y apoyarme en todo momento. TE AMO TENDIENDO A INFINITO y hasta ser polvo de estrella.

A mi familia extendida Vargas-Trujillo: mis suegros María e Ixcoatl y mis hermanos Ayari y Jorge. Gracias por todos los momentos inolvidables que hemos pasado juntos y por el gran cariño y confianza que me han tenido. LOS QUIERO MUCHO.

A mi tutora Martha Escobar, por ser una gran mentora y un ejemplo como investigadora. Gracias por transmitirme esa gran vocación a las Neurociencias y permitirme ser parte de tu valioso equipo, ya desde hace varios años. Definitivamente has sido un pilar en mi formación científica, te estimo mucho.

Gracias a mi comité tutor la Dra. Sofía Díaz y el Dr. Julio Morán, por sus valiosas contribuciones, semestre a semestre, en la elaboración de este proyecto de investigación. He tenido la dicha de tenerlos anteriormente como parte de mi comité y siempre se han mostrado muy atentos y amables conmigo, generando críticas constructivas. Los aprecio mucho.

Gracias a los miembros de mi jurado de examen, la Dra. María Isabel Miranda y la Dra. Livia Sánchez por su valioso tiempo dedicado y sus muy certeras observaciones. Les tengo un gran aprecio.

Gracias a mis compañeros y amigos de laboratorio los viejos y los nuevos: Alex, Luis, Esteban, Bea, Salma, Alfredo y Simón, porque a su lado la investigación es mucho más divertida de lo que intrínsecamente ya es. Gracias especialmente a Luis porque desde que te conozco (ya desde hace algún tiempo) siempre me has ayudado en lo que necesite y hemos formado un gran equipo de trabajo, lo que queda reflejado en los artículos que tenemos en colaboración. Gracias Alex, por tu amistad sincera y tu confianza, y por las miles de carcajadas que me has hecho soltar.

A mis amigos que he encontrado y conservado a lo largo de este divertido viaje que es la vida: Andrés, Ricardo, Dians, Anabel, Penélope, Maribel (Boleishon), Janina y Camila. Gracias por demostrarme que a pesar del paso del tiempo y la distancia siempre está presente su valiosa amistad. Los quiero mucho muchote.

Gracias al Dr. Lucas de Oliveira Alvares, por aceptarme como miembro de su laboratorio durante la estancia de investigación que realicé en la UFRGS, Porto Alegre, Brasil. A pesar del breve tiempo que estuve aprendí mucho y tuve la posibilidad también de compartir mis conocimientos. Gracias a los amigos que hice en ese laboratorio: Bruno, Enrique, Laura, Bruna, Rossana, Ana, Marcelo y Jadier, especialmente a Mirelle y Mateus, mil gracias por hacerme sentir en casa, me llevo muy gratos recuerdos y una gran amistad.

Al M. V. Z. Gabriel Solano por mostrarse siempre servicial y atento con la entrega y cuidado de mis sujetos experimentales. Gracias también a todos mis sujetos experimentales, las ratas Wistar, por sacrificar su vida a favor del avance científico y así lograr salvar más vidas que el 911.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado a través de la beca con número 260384 para realizar mis estudios de doctorado.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, PAPIIT por los apoyos proporcionados en el desarrollo de este proyecto de investigación (IN215816 e IN215719).

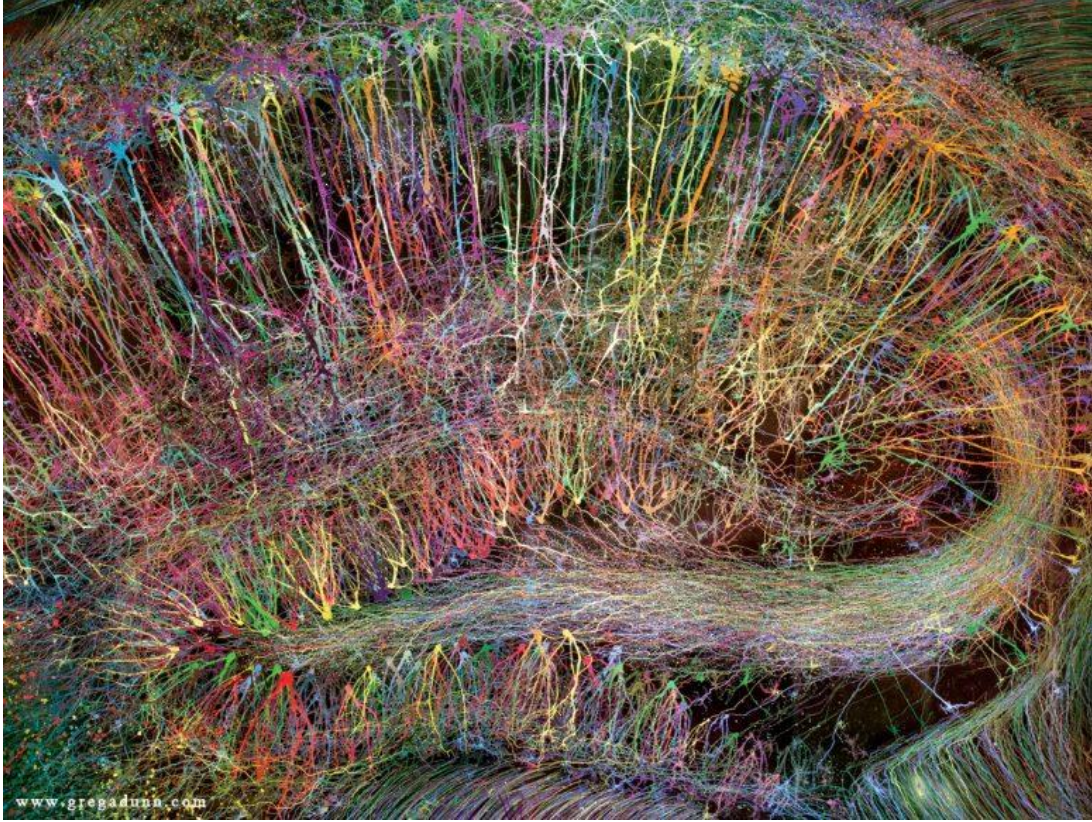
Sin todas estas personas, este proyecto no hubiera sido posible. Quedo profundamente agradecida con cada uno de ustedes.

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. GLOSARIO DE ABREVIATURAS	3
2. INTRODUCCIÓN	8
3. ANTECEDENTES	9
3.1. El aprendizaje y la memoria	9
3.2. Consolidación de sistemas	10
3.3. La potenciación de largo plazo (LTP) y su relación con los procesos de aprendizaje y memoria	13
3.4. Mecanismos moleculares de la LTP y la memoria	14
3.5. Neurotrofinas	17
3.5.1. BDNF: mecanismos moleculares asociados a la memoria	19
3.5.1.1. BDNF y plasticidad sináptica funcional	24
3.5.1.2. BDNF y plasticidad sináptica estructural	26
3.5.1.3. BDNF: transcripción y traducción génica	29
3.6. La corteza insular y la vía gustativa	31
3.6.1. El condicionamiento de aversión al sabor	35
3.6.2. Plasticidad sináptica en la corteza gustativa regulada por BDNF	37
3.7. Formación hipocampal	38
3.7.1. Mecanismos de transcripción y traducción en las FM	45

3.7.2. Plasticidad sináptica en las FM regulada por BDNF	46
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	49
5. OBJETIVO GENERAL	50
5.1. Objetivos particulares. Fase 1	50
5.2. Objetivos particulares. Fase 2	51
6. METODOLOGÍA GENERAL	51
6.1. Procedimiento experimental. Fase 1	52
6.1.1. Cirugía estereotáxica y microinfusión	52
6.1.2. Entrenamiento en el CAS	53
6.1.3. Histoquímica de Nissl	54
6.1.4. Diseño experimental. Fase 1	55
6.2. Procedimiento experimental. Fase 2	57
6.2.1. Procedimiento electrofisiológico	57
6.2.2. Técnica histoquímica de Timm	58
6.2.3. Análisis histológico	59
6.2.4. Diseño experimental. Fase 2	61
7. RESULTADOS	64
Fase 1	64
7.1. La administración de BDNF en la CI es capaz de fortalecer un trazo de memoria de aversión al sabor	64
Fase 2	66
7.2. El BDNF induce LTP en la vía de las FM a pesar de la inhibición de los procesos de transcripción génica y traducción de proteínas	67

7.3. El BDNF genera una reorganización estructural en el área CA3 del hipocampo de manera independiente de la síntesis de ARNm y de proteínas <i>de novo</i>	69
7.4. En contraste tanto la LTP como la reorganización estructural de las FM hipocampales inducidas por HFS requieren de síntesis de ARNm y de proteínas <i>de novo</i>	71
8. DISCUSIÓN	75
8.1. El BDNF regula el proceso de consolidación en la CI fortaleciendo la memoria de aversión al sabor	75
8.2. El BDNF es capaz de incrementar la eficiencia sináptica y la sinaptogénesis en la vía de las FM, de manera independiente tanto de la transcripción génica como de la traducción de proteínas	78
8.3. La LTP y la reorganización estructural en las FM hipocampales inducidas por HFS requieren de síntesis de ARNm y de proteínas <i>de novo</i>	83
9. CONCLUSIONES	84
10. REFERENCIAS	85
11. ANEXO 1	105
12. ANEXO 2	110
13. ANEXO 3	145



“We are, after all, our memories”

James McGaugh

RESUMEN

Entre las moléculas asociadas a los procesos de consolidación y persistencia de la memoria destaca la participación del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), que juega un papel relevante en la modulación de la plasticidad sináptica de la neocorteza y el hipocampo de cerebros adultos. Estudios previos de nuestro grupo de investigación muestran que la infusión aguda de BDNF tanto en la corteza insular (CI) como en el área CA3 del hipocampo es capaz de inducir potenciación de largo plazo (LTP). El hecho de que esta neurotrofina module la plasticidad sináptica en ambas estructuras hace posible analizar diferentes aspectos de su participación en la plasticidad sináptica neo y paleocortical. En primera instancia se analizó la participación del BDNF en el fortalecimiento de la memoria de aversión al sabor (CAS). Para ello se administró la neurotrofina en la CI inmediatamente después de la adquisición del CAS en dos diferentes condiciones uno “fuerte” y uno “débil”. Los resultados muestran que el BDNF transforma un CAS débil en uno fuerte, a través de mecanismos dependientes de la interacción con su receptor Trk. En la segunda fase se analizó si la LTP producida por BDNF en la vía de las FM hipocampales requiere de síntesis de nuevas proteínas y de ARNm para el mantenimiento tanto de la eficiencia sináptica como de la reorganización estructural. Para ello, se indujo LTP in vivo a través de la administración aguda de BDNF en el área CA3 del hipocampo, en presencia de un inhibidor de síntesis proteica o de un inhibidor de la síntesis de ARNm. Siete días después del procedimiento electrofisiológico, se evaluó la reorganización sináptica de las fibras musgosas hipocampales. Los resultados muestran que el BDNF hace posible tanto el incremento de la eficiencia sináptica como la modificación estructural de las FM de manera independiente de la síntesis de ARNm y de proteínas de novo.

Estos hallazgos en conjunto indican que el BDNF es un modulador esencial de la fortaleza y del mantenimiento de la plasticidad sináptica neo y paleocortical capaz de fortalecer el trazo de una memoria aversiva dependiente de la integridad de la corteza insular, así como de inducir y mantener la plasticidad sináptica funcional y estructural de las fibras musgosas hipocampales.

ABSTRACT

Among the molecules associated with the processes of memory consolidation and persistence, distinguish the participation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), which plays a relevant role in the modulation of the synaptic plasticity of the neocortex and hippocampus of adult brains. Previous studies from our group show that acute infusion of BDNF in both the insular cortex (IC) and the CA3 area of the hippocampus is capable of inducing long-term potentiation (LTP). The fact that this neurotrophin modulates the synaptic plasticity in both structures makes it possible to analyze different aspects of its participation in neo and paleo cortical synaptic plasticity. At first, we analyzed the participation of BDNF in the strengthening of taste aversion memory (CTA). For this purpose, the neurotrophin was administered in the IC immediately after the CTA acquisition in two different conditions: one "strong" and one "weak". The results show that BDNF transforms a weak CTA into a strong one, through mechanisms dependent on the interaction with its Trk receptor. In the second phase, it was analyzed whether the LTP induced by BDNF in the hippocampal MF pathway requires of new protein synthesis and mRNA for the maintenance of both synaptic efficiency and structural reorganization. Accordingly, *in vivo* LTP was induced through the acute administration of BDNF in the hippocampal CA3 area, in the presence of either an inhibitor of mRNA synthesis or protein synthesis. Seven days after the electrophysiological procedure, the synaptic reorganization of the hippocampal mossy fibers was evaluated. Our results show that BDNF is able to induce a lasting potentiation of synaptic efficacy at the MF projection accompanied by a structural reorganization at the CA3 area in an mRNA synthesis and protein translation-independent manner.

These findings together indicate that BDNF is an essential modulator of the strength and maintenance of neo and paleocortical synaptic plasticity, able to strengthen the tracing of an aversive memory dependent on the integrity of the IC, as well as to induce and maintain the functional and structural synaptic plasticity of the hippocampal MF.

1. GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ANI	Anisomicina
AP	Antero-posterior
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNPI	ARN Polimerasa tipo I
ARNPII	ARN Polimerasa tipo II
ARNPIII	ARN Polimerasa tipo III
ATP	Adenosín trifosfato
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BLA	Amígdala basolateral
CaMKII	Proteína cinasa tipo II dependiente de calcio-calmodulina cinasa tipo II
CAS	Condicionamiento de aversión al sabor
CASd	CAS débil
CASf	CAS fuerte
CEA	Amígdala central
CI	Corteza insular

CNTRL	Control
CR	Colaterales recurrentes
CREB	Proteína de unión responsivo al elemento de AMPc
DAG	Diacilglicerol
DCG-IV	(2 <i>S</i> ,2' <i>R</i> ,3' <i>R</i>)-2-(2',3'-Dicarboxiciclopropil glicina)
DRB	5,6-dicloro-1-β-D ribofuranozilbenzimidazol
DREED	Receptores activados exclusivamente por drogas de diseño
DV	Dorso-ventral
ECP	Proteasa extracelular
eIF4E	Factor de iniciación de la traducción eucarionte 4
E-LTP	Fase temprana de la LTP
ERK	Proteína Cinasa regulada por una señal extracelular
FM	Fibras musgosas
FRET	Transferencia de energía por resonancia de florescencia
ga	Gauge
GD	Giro dentado

Glu	glutamato
Grb2	Proteína adaptadora 2 unida al receptor del factor de crecimiento
HFS	Estimulación de alta frecuencia
IIP-FM	Proyección intra e infrapiramidal de las fibras musgosas
IP3	Inositol trifosfato
K252a	Inhibidor de los receptores a tropiomiocina cinasa
LiCl	Cloruro de litio
L-LTP	Fase tardía de la LTP
LTP	Potenciación de Largo Plazo
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
mBDNF	BDNF maduro
MCP	Memoria de corto plazo
MEK	Proteína cinasa regulada por mitógeno y por señales extracelulares
mGlu5	Receptores metabotrópicos de glutamato tipo 5
mGluRII	Receptores metabotrópicos de glutamato del grupo II
ML	Medio-lateral
MLP	Memoria de largo plazo

mTOR	Proteína blanco de rapamicina en mamíferos
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NMDA	N-metil-D-aspartato
NPB	Núcleo posteromedial parabraqueal
NPb	Núcleo parabraqueal
NT 4/5	Neurotrofina 4/5
NT6	Neurotrofina 6
NT7	Neurotrofina 7
NTS	Neurotrofinas
NTS	Núcleo del tracto solitario
p75NTR	Receptor p75
PI3k	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato-3-cinasa
PKA	Proteína cinasa dependiente de AMPc
PKC	Proteína cinasa C
PLCγ	Fosfolipasa C γ
PPSEs	Potenciales Postsinápticos Excitatorios
proNTS	Proneurotrofinas
Rab3A	Proteína rabfilina 3A
RNAPolII	Proteína RNA Polimerasa tipo II
SL	Estrato lúcido

SNC	Sistema Nervioso Central
SO	Estrato oriens
Sos	Proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina “son of the seventhless”
SP	Estrato piramidal
SP-FM	Haz suprapiramidal de las fibras musgosas
Src	Proteína celular homóloga a la proteína del virus Rous sarcoma
tPA	Activador tisular del plasminógeno
Trk	Receptores de tropiomiocina cinasa
TrkA	Receptor de tropiomoicina cinasa tipo A
TrkB	Receptor de tropiomoicina cinasa tipo B
TrkC	Receptor de tropiomoicina cinasa tipo C
VPM	Núcleo ventral posteriomedial del tálamo

2. INTRODUCCIÓN

El tratar de dilucidar los mecanismos mediante los cuales el sistema nervioso central (SNC) almacena información por periodos prolongados ha representado un reto para las neurociencias en los últimos años. Entre las estrategias utilizadas para develar dichos mecanismos se encuentra el estudio de las modificaciones de la eficiencia sináptica de larga duración y de la reorganización estructural dependientes de la actividad. Estos fenómenos tienen especial relevancia para el estudio de los fenómenos de aprendizaje y memoria, además de otros comportamientos adaptativos, debido a que representan expresiones de plasticidad sináptica de larga duración (Malenka y Bear, 2004). Así, se ha descrito que la persistencia de la memoria es resultado directo de la participación de eventos celulares y moleculares. En este sentido, la consolidación y la persistencia de la memoria están mediadas tanto por mecanismos moleculares que regulan la transcripción de genes, como por mecanismos epigenéticos que modulan la expresión de ésta, produciendo modificaciones de largo plazo (Stafford y Lattal, 2011). Entre las proteínas relacionadas a la persistencia de la memoria se ha revelado la participación crucial de una familia de proteínas llamadas neurotrofinas, entre cuyas funciones se encuentra el controlar la sobrevivencia, el crecimiento y las capacidades funcionales de poblaciones específicas de neuronas (Lu et al., 2005).

3. ANTECEDENTES

3.1. El aprendizaje y la memoria

El aprendizaje es el mecanismo a través del cual adquirimos información acerca del mundo, mientras que la memoria es el procedimiento por el cual este conocimiento es codificado, almacenado y más tarde recuperado (Kandel et al., 2000). Para su estudio, se han generado varias clasificaciones, y una de las más empleadas es la que clasifica este proceso con base en una línea temporal de la información almacenada (**Figura 1**).

La memoria de corto plazo es de breve duración, aproximadamente de entre segundos a pocas horas, mientras que la memoria de largo plazo es más duradera e incluso puede mantenerse a lo largo de toda la vida. Existe una transición de la memoria de corto a la de largo plazo, que depende de varias características intrínsecas al evento, lo cual ocurre dentro de un proceso denominado consolidación (McGaugh, 2000). Este proceso se refiere a una progresiva estabilización post-adquisición de la información hacia el largo plazo, que es dependiente del tiempo y durante la cual la memoria es susceptible de ser alterada, por ejemplo, debido a la administración de fármacos que inhiben la síntesis de nuevas proteínas o de ácido ribonucleico mensajero (ARNm). La propuesta del requerimiento de esta fase para generar un trazo de memoria estable fue desarrollada por Müller y Pilzecker desde principios del siglo XX (Squire y Kandel, 1999).

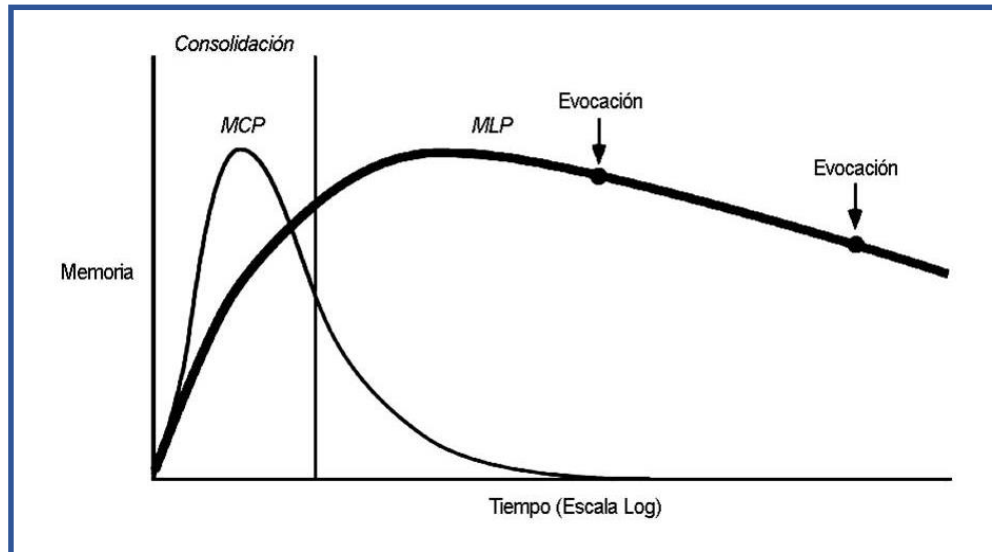


Figura 1. Clasificación temporal de la memoria. La figura muestra la clasificación de la memoria con referencia al tiempo. Ésta consta de la memoria de corto plazo (MCP) y de la memoria de largo plazo (MLP). Entre estas dos fases se encuentra el proceso de consolidación y la memoria está sujeta a la evocación. (Modificado de Dudai, 2004).

3.2. Consolidación de sistemas

El proceso de consolidación puede ser estudiado desde distintos niveles de análisis entre los cuales se incluye la consolidación celular y la consolidación de sistemas. A nivel celular, para que las nuevas memorias sean transferidas a un almacén de largo plazo se requiere de síntesis de nuevas proteínas, así como de nuevo ARNm que posibiliten las modificaciones persistentes de la arquitectura sináptica (Dudai y Morris, 2000). Por su parte, la consolidación de sistemas ha sido descrita como el proceso por el cual las memorias, inicialmente dependientes del hipocampo, son reorganizadas en regiones de la neocorteza con el paso del tiempo (Squire et al., 2015).

Las bases de la teoría de consolidación de sistemas se establecen a partir de estudios psicológicos en pacientes que sufrieron daño cerebral en regiones restringidas del lóbulo temporal medial y del hipocampo. En estos pacientes se observó que la memoria formada recientemente era más susceptible de alteración en comparación con las memorias remotas (Scoville y Millner, 1957; Eslinger, 1998; Bayley et al., 2003; Buchanan et al., 2005; Kirwan et al., 2008; Kopelman y Bright, 2012; citados por Squire et al., 2015). Estas evidencias han sido apoyadas por investigaciones realizadas en animales, en las cuales se ha reportado que las lesiones electrolíticas, excitotóxicas o la inactivación farmacológica del hipocampo en roedores afectan la evocación de la memoria reciente, pero no de la remota (Kim y Fanselow, 1992; LeDoux y Nader, 2002; Restivo et al., 2001; Winocour et al., 2009, 2013; Goshen et al., 2011; Tayler et al., 2013; citados por Wiltgen y Tanaka, 2013). Incluso se ha descrito que el diálogo entre el hipocampo y la neocorteza involucra a las denominadas “sharp-wave ripples”, que son oscilaciones breves (alrededor de 100 milisegundos) con una frecuencia mayor a los 100 Hz. Estas oscilaciones suelen observarse durante el sueño de ondas lentas y son un indicador de la repetición de experiencias recientes (Girardeu, et al., 2009; Ego-Stengel y Wilson, 2010; Maingret et al., 2016; Yamamoto y Tonegawa, 2017). Estos eventos podrían coordinar la actividad hipocampo-neocorteza durante el almacenamiento de información (Nakashiva et al., 2009; Ego-Stengel y Wilson, 2010; Jadhav et al., 2012; citados por Wiltgen y Tanaka, 2013; y por Tonegawa, Morrissey y Katimura, 2018). Esta serie de hallazgos respaldan la idea de que el hipocampo es esencial para la formación y evocación de las memorias recientes, teniendo una función de almacén temporal;

mientras que los trazos de memoria permanente se estabilizan en regiones neocorticales (Alvarez y Squire, 1994; Tonegawa, Morrissey y Katimura, 2018).

Sin embargo, estudios realizados en humanos empleando imagenología funcional, han mostrado que la actividad del hipocampo incrementa ante la evocación de memorias tanto recientes como remotas (Moscovitch et al., 2006; Rekkas y Constable, 2005). Efectos similares han sido reportados en modelos animales utilizando lesiones electrolíticas, mostrando que las lesiones en el hipocampo impiden la evocación de la memoria al contexto sin importar la antigüedad de la misma (Lehmann et al., 2007; Sparks et al., 2011; citados por Squire et al., 2015).

Estudios recientes utilizando técnicas como la optogenética han desarrollado un nuevo supuesto que reconcilia ambos puntos de vista. Esta propuesta señala que una rápida generación de engramas celulares que se encuentran en estado silente en áreas neocorticales, tiene lugar mientras se lleva a cabo el aprendizaje de una tarea. Dichos engramas presentan una maduración lenta durante el periodo de post-entrenamiento, que es auxiliada por los engramas activos en el hipocampo. Este proceso de maduración involucra el aumento en la densidad de espinas dendríticas en la neocorteza, la cual también requiere de la actividad de los engramas hipocampales (Tonegawa, Morrissey y Katimura, 2018).

3.3. La potenciación de largo plazo (LTP) y su relación con los procesos de aprendizaje y memoria

La memoria se refleja en la capacidad de las neuronas para modular las respuestas evocadas por un estímulo y para reactivar una respuesta en ausencia del estímulo que la originó (Eichenbaum, 1996). La potenciación de largo plazo (LTP) de la transmisión sináptica excitatoria es un fenómeno experimental que ha contribuido sustancialmente al estudio de los procesos de aprendizaje y memoria. La LTP fue descrita inicialmente en 1973 por Bliss y Lomo, quienes reportaron que al aplicar trenes breves de alta frecuencia en la vía que va del patrón perforante al giro dentado en el hipocampo de conejos, aumentaba la fuerza de las conexiones sinápticas (Bliss y Lomo, 1973). Actualmente la LTP es definida como el incremento prolongado de la eficiencia sináptica debido a la estimulación de las vías aferentes a un área determinada del sistema nervioso y se sabe que puede ser inducida en diferentes zonas cerebrales (Mayford et al., 2012).

Además de su persistencia en el tiempo, la LTP posee características que la convierten en una poderosa herramienta para explicar los eventos que, a nivel celular, bioquímico y molecular, subyacen a la plasticidad sináptica relacionada con la memoria, tales como la especificidad, asociatividad y cooperatividad.

Existen numerosas evidencias que muestran la estrecha relación entre los procesos de aprendizaje y memoria con el fenómeno de la LTP. Algunos de estos ejemplos son los estudios realizados por dos grupos independientes en la región de la amígdala. En este sentido, Rogan y cols. (1997) demostraron *in vivo* que el

condicionamiento de miedo al tono produce incrementos en la pendiente y en la amplitud de los potenciales postsinápticos excitatorios (PPSEs) en la amígdala lateral de ratas adultas (Rogan et al., 1997). De manera similar, McKernan y Shinnick-Gallagher (1997), demostraron que 24 hrs después del entrenamiento en una tarea de condicionamiento al miedo, se producía una facilitación presináptica en la amígdala lateral en preparaciones *in vitro* (McKernan y Shinnick-Gallagher, 1997). En la corteza motora primaria de ratas adultas se han observado cambios en la eficiencia sináptica después de haber efectuado una tarea de aprendizaje de habilidad motora, mostrando que la amplitud de los PPSEs en la corteza motora del hemisferio entrenado aumentó significativamente con respecto a la corteza motora primaria del hemisferio contralateral (Rioult-Pedotti et al., 1998). En concordancia con lo anterior, en un estudio en el hipocampo se mostró un incremento de la eficiencia sináptica en el área CA1 de ratas adultas *in vivo* después del entrenamiento en una tarea dependiente de la actividad hipocampal (Whitlock et al., 2006).

3.4. Mecanismos moleculares de la LTP y la memoria

Se ha descrito que la adquisición de la memoria tiene lugar tras la modificación de la transmisión sináptica entre las neuronas involucradas, en tanto que la consolidación requiere, en adición, de expresión de nuevos genes y de síntesis de proteínas. El principal sistema de neurotransmisión sináptica excitatoria en el hipocampo y otras regiones estructurales, como la neocorteza, es de naturaleza glutamatérgica (Bear et al., 2016).

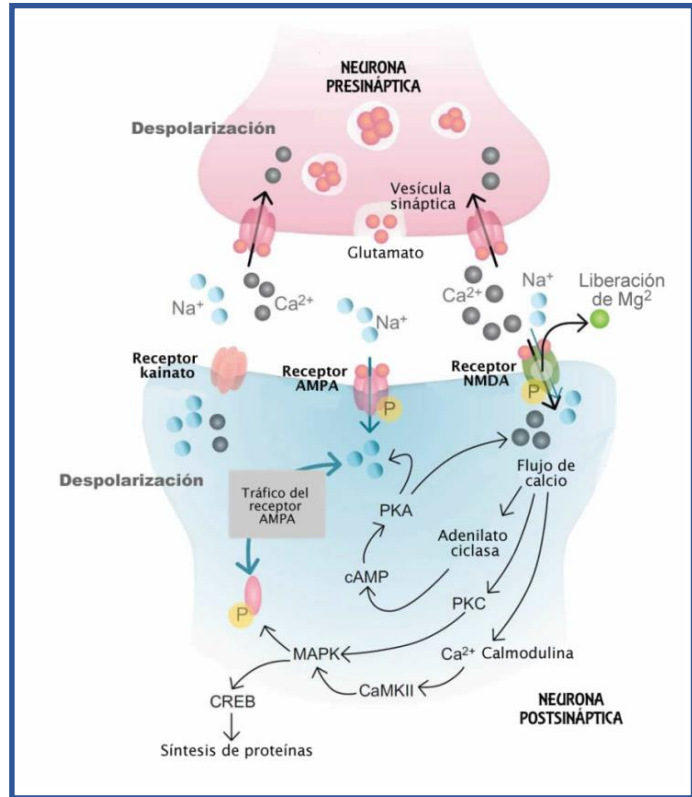
Durante la actividad, las terminales presinápticas liberan glutamato al espacio extracelular, y este neurotransmisor activa a los receptores AMPA (ácido γ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico) de la célula postsináptica, permitiendo la entrada de Na^+ al interior de la célula. Otro tipo de receptores, los NMDA (N-metil-D-aspartato), aunque también se activan ante la presencia de glutamato, se encuentran bloqueados por el ion Mg^{2+} y para eliminar este bloqueo es necesario la despolarización de la membrana, lo cual ocurre gracias a la entrada de Na^+ a través de receptores como AMPA. Los receptores NMDA además son permeables a Ca^{2+} (Malenka y Bear, 2004). Así, la entrada de calcio a través de los receptores NMDA específicamente señala cuando los elementos pre y postsinápticos están activos al mismo tiempo. Los iones de calcio activan diferentes vías de señalización, muchas de las cuales incluyen proteínas cinasas y fosfatasas, dependiendo de la cantidad de calcio entrante. Estas proteínas cinasas son necesarias para mantener la LTP y la memoria por periodos de tiempo prolongados.

Una de las proteínas cinasas activadas por calcio es la proteína cinasa tipo II dependiente de calcio-calmodulina (CAMKII), que funciona como una señal para desencadenar varias vías de transducción de señales en el interior de la célula (Lisman et al., 2002; Lambroso y Ogren, 2009). El calcio que entra a la célula también produce la activación de la proteína adenilato ciclasa, la cual produce adenosín monofostato cíclico (AMPc) a partir de moléculas de adenosín trifosfato (ATP). Este AMPc producido, activa, entre otros blancos, a la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA). Al ser activada esta proteína, ocurre una disociación de su sub unidad reguladora de la catalizadora, permitiendo la translocación de esta

última al núcleo. Una vez en el interior del núcleo, transfiere sus grupos fosfato para la activación de factores de transcripción como la proteína de unión responsivo al elemento de AMPc (CREB) que interviene en la modulación de la transcripción de varios genes implicados en la plasticidad sináptica (Meinkoth et al., 1993). La proteína PKA también favorece la fosforilación de varios substratos blanco, incluyendo las subunidades de receptores a glutamato, como los de tipo AMPA (Lambroso y Ogren, 2009).

En este orden de ideas, otra proteína implicada en el mantenimiento de la memoria por periodos prolongados es la cinasa regulada por señal extracelular (ERK), un miembro de la familia de las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK). De hecho, se ha descrito que varios aspectos de la señalización de ERK son críticos para la consolidación de la memoria. Uno de estos aspectos es que la actividad de ERK es requerida para iniciar la traducción local de los ácidos ribonucleicos mensajeros (ARNm) presentes en las espinas dendríticas. Una segunda función es su rápida translocación al núcleo de las neuronas, donde produce la fosforilación de varios factores regulatorios de la transcripción, lo cual favorece la transcripción de diversos ARNm que son transportados a lo largo de las dendritas hacia las espinas y las sinapsis (Atkins et al., 1998; Lambroso y Ogren, 2009) (**Figura 2**).

Figura 2. Algunos mecanismos moleculares implicados en el mantenimiento de la memoria. La señalización de la pre a la post sinapsis desencadena varios eventos, entre ellos, la activación de vías de señalización que activan factores de transcripción favoreciendo la síntesis de nuevas proteínas (Modificado de Korte y Schmitz, 2016).



Asimismo, ya desde hace varias décadas se ha descrito que ciertos factores tróficos juegan un papel muy importante en la persistencia de la memoria (Kang y Schuman, 1995; Bramhan et al., 1996).

3.5. Neurotrofinas

La diversidad celular es derivada de la orquestación de procesos diversos y complejos tales como la proliferación, diferenciación, crecimiento, migración y formaciones sinápticas. Dentro de los mensajeros químicos involucrados en tales procesos se encuentra una familia de proteínas llamadas neurotrofinas (NTs), conformada por el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina 3 (NT-3), la neurotrofina 4/5 (NT-4/5), así

como por la neurotrofina 6 (NT-6) y la neurotrofina 7 (NT-7). Las NTs (como otros péptidos) son sintetizados como proneurotrofinas (proNTs) que son precursores de las proteínas maduras, las cuales son procesadas por un número diverso de enzimas que convierten a las proneurotrofinas en proteínas maduras una vez que alcanzan el espacio extracelular (Gómez-Palacio-Schjetnan y Escobar, 2013). En su forma madura cada una de estas proteínas forma un complejo con otra proteína similar, conformando una estructura dimérica que permite la activación de sus receptores específicos que son los receptores tropiomocina cinasa (TrkA, TrkB y TrkC). Además, cada neurotrofina, en su forma inmadura activa al receptor p75 (p75^{NTR}), miembro de la súper familia de los receptores del factor de necrosis tumoral (Lu et al., 2005) (**Figura 3**).

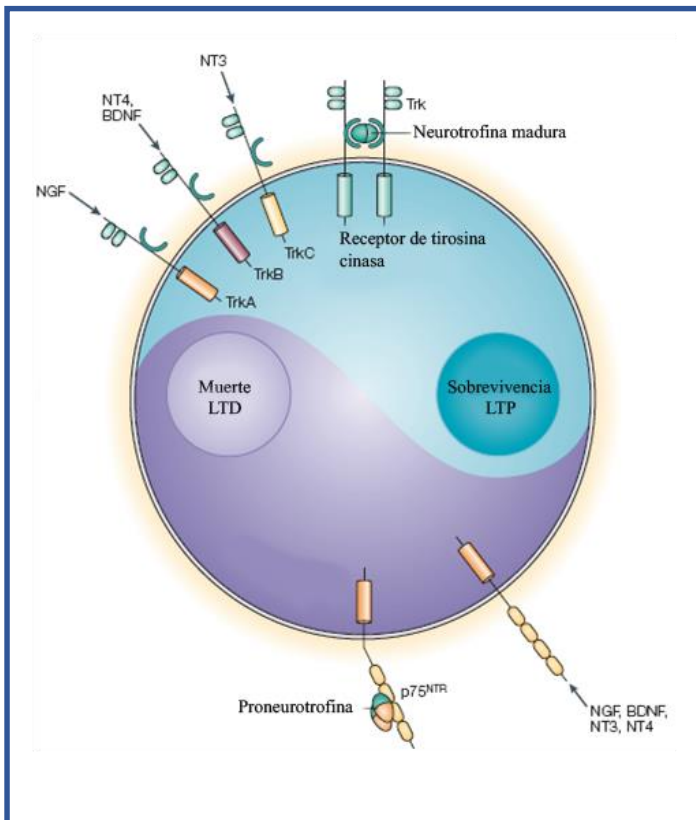


Figura 3. El ying y el yang de los receptores a neurotrofinas y su función. Las acciones de las neurotrofinas son mediadas por dos clases de receptores transmembranales: Trk y p75^{NTR}, los cuales preferencialmente se unen a proteínas maduras y proneurotrofinas, respectivamente, produciendo respuestas biológicas opuestas tales como LTP y LTD. Cada receptor de neurotrofinas - TrkA, TrkB, TrkC y el receptor p75 (p75^{NTR})— es caracterizado por afinidades específicas para cada neurotrofina –NGF, BDNF, NT3, NT4-. (Modificado de Lu et al., 2005)

Una importante característica de la acción de las neurotrofinas es su capacidad para autorregular su producción, así como para regular la producción de otros miembros de su familia de proteínas. Por ejemplo, se ha demostrado que la aplicación de BDNF incrementa la expresión de BDNF, NGF y NT-3 en neuronas corticales (Patz y Wahle, 2004).

Aunado a su importancia dentro del desarrollo temprano del sistema nervioso, evidencias recientes indican que las neurotrofinas también pueden actuar como mediadores de la plasticidad sináptica en el sistema nervioso adulto (Bramham et al., 1996; Schinder y Poo, 2000).

En este sentido, se ha reportado, por ejemplo que la aplicación exógena de BDNF y NT-3 inducen incrementos en la transmisión sináptica que son mantenidos en el largo plazo (Kang y Schuman, 1995). De manera similar, un estudio de nuestro grupo de investigación ha demostrado que la administración aguda de NT-3 induce potenciación de largo plazo en la vía de proyección de las fibras musgosas al giro dentado, así como una reorganización estructural de las mismas (Ramos-Languren y Escobar, 2013)

3.5.1. BDNF: mecanismos moleculares asociados a la memoria

De acuerdo con evidencias recientes, se ha descrito que el BDNF es una molécula que puede ser sintetizada y secretada tanto de manera presináptica por los axones neuronales, como por otros componentes de las sinapsis incluyendo las dendritas postsinápticas, los astrocitos y la microglía (Lessmann y Brigadski, 2009; Parpura et

al., 2010; Parkhurst et al., 2013; Harward et al., 2016; citados por Song, Martinowich y Lee, 2017). Tanto su expresión como su señalización correlacionan positivamente con la actividad neuronal, propiciando una modulación sináptica dependiente de la actividad (Kohara et al., 2001; Kolarow et al., 2007; Matsuda et al., 2009; citados por Ehrlich y Josselyn, 2016). Esta neurotrofina puede ser encontrada en dos formas: 1) forma inmadura, conocida como pro-BDNF, la cual puede unirse a los receptores p75 o bien ser escindida por proteasas extracelulares produciendo una proteína madura; 2) en su forma madura actúa en forma de dímero para activar a los receptores TrkB de manera tanto pre como en postsináptica, produciendo la dimerización y autofosforilación de los mismos.

El BDNF es secretado en respuesta a la actividad y en los sitios presinápticos, incrementa la exocitosis de las vesículas que contienen glutamato. De manera postsináptica, la señalización del complejo BDNF-TrkB induce la fosforilación de los receptores NMDA, que incrementa la probabilidad de apertura del canal iónico. Por otra parte, también incrementa la fosforilación y la inserción a la membrana de los receptores AMPA. Durante la LTP en fase temprana (E-LTP, por sus siglas en inglés), el flujo de calcio a través de los receptores NMDA activa a las proteínas PKC y CaMKII que fosforilan varios sustratos, incluyendo a los receptores AMPA, para mantener un incremento en la eficiencia sináptica (Leal et al., 2017) (**Figura 4**).

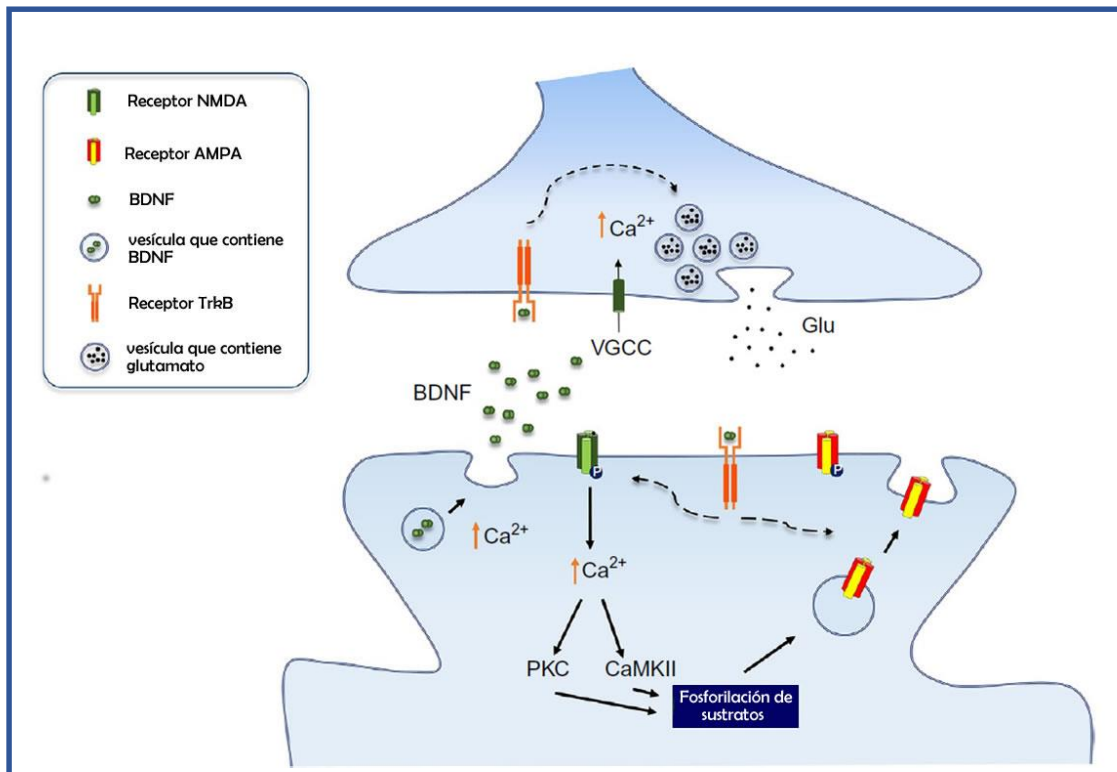


Figura 4. El BDNF modula las sinapsis excitatorias durante la LTP. El BDNF actúa a través de sus receptores de alta afinidad, TrkB, tanto pre como postsinápticos para regular el incremento en la eficiencia sináptica de sinapsis excitatorias. (Modificado de Leal et al., 2017).

La subsecuente unión de proteínas adaptadoras intracelulares permite la activación de tres principales vías de señalización: proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK, por sus siglas en inglés), fosfatidil inositol 3-cinasa (PI3K, por sus siglas en inglés) y fosfolipasa C- γ (PLC γ). La autofosforilación de los receptores TrkB en residuos específicos de tirosina, permite la activación diferencial de sus vías de señalización. De esta manera, la fosforilación en el residuo 515 de tirosina (Y515) permite la unión de la proteína adaptadora de transformación 1 (proteína SHC1), que recluta a la proteína adaptadora, Grb2 (del inglés proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento), formando un complejo con la proteína Sos (del inglés son of

sevenless). La proteína Sos es un factor de intercambio por la proteína Ras, que actúa desencadenando la activación río abajo de la vía MAPK (MEK y ERK, cinasas reguladas por señalización extracelular) (Huang y Reichardt, 2003; citados por Ehrlich y Josselyn, 2016).

En este sentido se ha demostrado que durante la inducción de LTP en la vía de proyección que va del patrón perforante al giro dentado, producida por la administración de BDNF, ocurre un incremento significativo en la expresión de proteínas MEK y ERK. De esta manera se ha identificado a la proteína ERK 1/2 como un elemento esencial para la consolidación de la información, de tal manera que el mantenimiento de la LTP y los incrementos en la densidad de espinas dendríticas originados por ésta, requieren de su presencia (Ying et al., 2002; Alonso et al., 2002). Otra vía que suele activar la señalización de este receptor (TrkB) es la PLC γ . En relación a ello, experimentos realizados por el grupo de Minichiello han mostrado que la mutación del residuo de tirosina 816 del receptor TrkB, que impide la activación de PLC γ , causa decrementos significativos en la LTP en la vía que va de las colaterales de Shaffer al área CA1 del hipocampo (Korte et al., 2000; Minichiello et al., 2002; Gruart et al., 2007). La activación de las vías de señalización antes mencionadas conduce a la síntesis de nuevas proteínas por medio de la activación de factores de transcripción como CREB y de factores de iniciación como el factor de iniciación de la traducción eucarionte 4 (eIF4E, por sus siglas en inglés), relacionados con la formación de nuevos contactos sinápticos, así como a la activación de genes de expresión temprana tales como *c-fos*, *c-jun* y *Zif268*. Por otra parte, la activación del receptor TrkB también promueve la activación de la vía

señalizadora Rho GTPasas, la cual contribuye de manera importante con las modificaciones estructurales de las sinapsis promoviendo la polimerización de actina (Shen et al., 2006; Miyamoto et al., 2006; Hedrick et al., 2016). Estas evidencias demuestran que la activación de los receptores TrkB desencadenan potentes vías de señalización que interactúan entre sí durante la generación de procesos plásticos de largo plazo en el sistema nervioso (**Figura 5**).

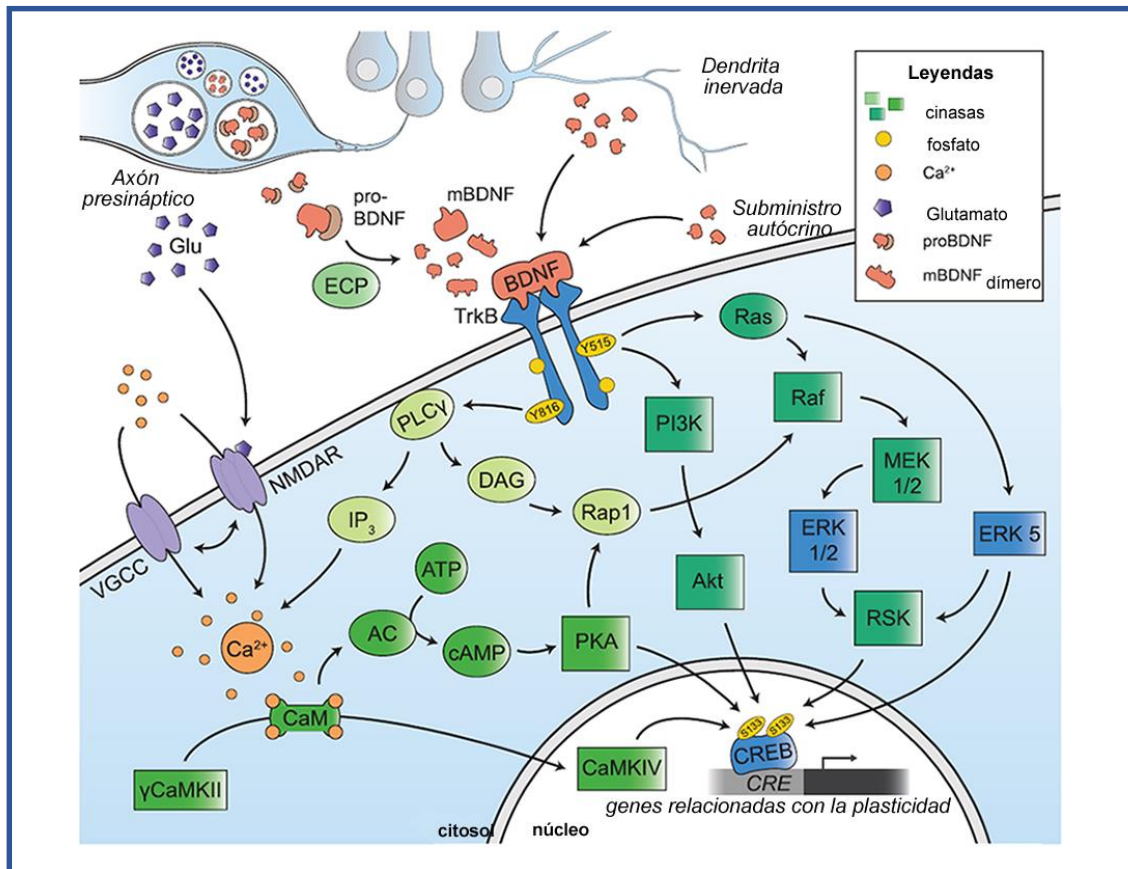


Figura 5. Vías de señalización intracelular activadas por BDNF. El BDNF en forma madura produce la dimerización y activación de los receptores TrkB y una subsecuente señalización río abajo. La fosforilación en el residuo 515 de tirosina conduce a la activación de las vías de señalización: Ras-ERK y PI3K, mientras que la fosforilación del residuo 816 conduce a la señalización a través PLC γ . A través de la activación de IP₃ (inositol trifosfato) y la subsecuente elevación de los niveles de calcio citosólico, la PLC γ induce la señalización al núcleo a través de las proteínas CaMKII. Estas vías de señalización complementaria son cada una, capaces de fosforilar CREB y promover la transcripción de genes regulados por CREB. AC, la adenilato ciclasa; DAG, diacilglicerol; ECP, proteasa extracelular; Glu, glutamato; mBDNF, BDNF maduro. (Modificado de Ehrlich y Josselyn, 2016).

3.5.1.1. El BDNF y la plasticidad sináptica funcional

En el SNC adulto se ha encontrado una alta expresión de BDNF así como de su receptor de alta afinidad, TrkB, en diferentes regiones cerebrales incluido el hipocampo (particularmente en las terminales presinápticas de las fibras musgosas) y en la neocorteza (Conner et al., 1997; Drake et al., 1999). **(Figura 6)**

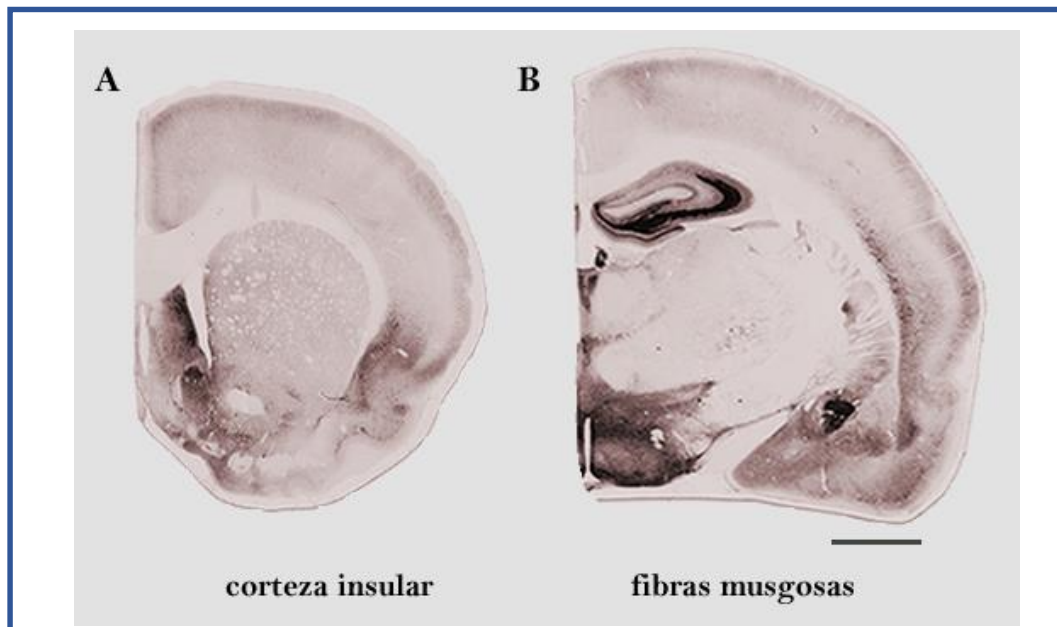


Figura 6. Distribución de la proteína BDNF en la corteza insular y el hipocampo. Inmunohistoquímica usando un anticuerpo para BDNF específico. Se observa una alta expresión de BDNF en numerosas estructuras cerebrales, entre ellas la corteza insular (A) y en la región del giro dentado y el área CA3 del hipocampo, la vía de las FM (B). Escala de la barra 3 mm. (Modificado de Conner et al., 1996).

La plasticidad sináptica puede ser definida como un cambio dependiente de la experiencia en la fuerza de la comunicación sináptica (Bliss y Collingridge, 1993). Hoy en día es ampliamente aceptado que la función del BDNF en el cerebro adulto es la regulación de la comunicación sináptica con efectos a nivel tanto funcional como estructural en rangos temporales de corto y largo plazo en sinapsis excitatorias e

inhibitorias en numerosas estructuras cerebrales. En este sentido, como se mencionó en líneas anteriores, se sabe que el BDNF juega un papel importante en la modulación e inducción de plasticidad sináptica en distintas regiones cerebrales incluidas la neocorteza y el hipocampo (Akaneya et al., 1997; Huber et al., 1998; Jiang et al., 2001; citados por Lu et al., 2014).

Por ejemplo, se ha reportado que la inducción de LTP produce un incremento en los niveles de ARNm tanto de BDNF como del receptor TrkB (Bramham et al., 1996; Poo, 2001). Adicionalmente, se ha demostrado que los ratones knockout heterocigotos para BDNF (BDNF^{+/-}) exhiben un deterioro en la inducción de la LTP tanto en la vía de las colaterales de Shaffer como en la vía de las fibras musgosas, así como un impedimento en la consolidación de la memoria de miedo al tono; esto último debido a que los ratones BDNF^{+/-} presentan un déficit en las sinapsis cortico-amígdala lateral (Korte et al., 1995; Patterson et al., 1996; Huang et al., 2008; Meis et al., 2017). Una investigación reciente efectuada en ratones knockdown heterocigotos para BDNF, reveló que esta neurotrofina es necesaria para la expresión de la fase temprana de la LTD, así como para la inducción y mantenimiento de la LTP en las colaterales de Schaffer. Asimismo, su expresión es requerida para la persistencia de la memoria espacial (Aarse et al., 2016).

Aunado a los estudios citados previamente, donde se observa que la deficiencia en los niveles de BDNF provoca alteraciones en la plasticidad sináptica, encontramos otros estudios en los cuales se muestra que el BDNF exógeno potencia la eficiencia sináptica. Por ejemplo, un estudio ha revelado que la aplicación de BDNF en rebanadas hipocampales, que previamente fueron estimuladas con una estimulación

tetánica débil (tres ráfagas de cuatro pulsos a 100 HZ) lo cual normalmente induce una LTP de corta duración, se produce una LTP de larga duración (Pang et al., 2004).

Estudios recientes han demostrado que algunos de los fármacos potenciadores de la cognición aumentan la plasticidad sináptica y la activación de las vías de señalización de BDNF. En este contexto, se ha reportado que la sobreexpresión transgénica de la proteína tPA (activador plasminógeno del tejido), una proteasa extracelular implicada en la conversión del precursor de BDNF a BDNF maduro aumenta tanto la LTP hipocampal, como la memoria espacial dependiente de hipocampo (Madani et al., 1999). De manera similar, un estudio reciente ha demostrado que el incremento en la memoria de miedo contextual producida por la hormona glucocorticoide involucra a la vía de señalización tpA-BDNF-TrkB (Revest et al., 2014). La evidencia anterior señala que el BDNF es una proteína relacionada a la plasticidad crucialmente implicada en el incremento y la regulación de los mecanismos asociados a la inducción y mantenimiento de la plasticidad sináptica por periodos prolongados.

3.5.1.2. BDNF y plasticidad sináptica estructural

Los cambios en la morfología de las sinapsis son descritos como un indicio de la estabilidad de la plasticidad sináptica. En este contexto, el BDNF ha sido evidenciado como una proteína clave en la inducción y prevalencia de las modificaciones morfológicas dependientes de la actividad en el cerebro adulto (Bramham y

Messaoudi, 2005; Bramham, 2007). Por ejemplo, un estudio desarrollado por Kuipers y colaboradores muestra que la LTP inducida por BDNF en la vía del patrón perforante, produce un incremento en la neurogénesis hipocampal en forma bilateral el cual está asociado a la expresión génica de Arc/Arg 3.1 (Kuipers et al., 2016).

Las modificaciones estructurales de las espinas dendríticas dependen de cambios persistentes en el citoesqueleto. En el hipocampo adulto, la aplicación de estimulación tetánica activa la vía de señalización BDNF-TrkB favoreciendo la polimerización de actina en las espinas dendríticas, que se requiere para la estabilización de la fase tardía de la LTP (Rex et al., 2007; Fukazawua et al., 2003). De esta forma, el BDNF induce cambios estructurales a través de la activación de las vías de señalización TrkB-RAS-MAPK y PI3K-AKT-mTOR (Alonso et al., 2004; Kumar et al., 2005; citados por Park y Poo, 2013). Un estudio realizado por Tanaka y colaboradores, mostró que en las sinapsis entre las áreas CA3 y CA1 del hipocampo, el alargamiento de las espinas dendríticas producido por la LTP es dependiente de la secreción endógena de BDNF y de síntesis de proteínas (Tanaka et al., 2008). Así, el BDNF puede actuar tanto con una señalización autócrina como parácrina para producir cambios en la morfología de la espina que son dependientes de síntesis de proteínas.

Más aún, la síntesis local de BDNF en las dendritas, puede promover la plasticidad estructural. En cultivo de neuronas hipocampales, la traducción local de BDNF en las dendritas incrementa tanto la maduración como la densidad de las espinas dendríticas (Verpelli et al., 2010). De manera similar, en un estudio conducido por Liao y colaboradores, se observó que el BDNF exógeno incrementa la

expresión de proteínas relacionadas a la plasticidad, en los somas neuronales y en las dendritas, en cultivos celulares de neuronas corticales (Liao et al., 2007). Por otra parte, en un trabajo de investigación utilizando la técnica de FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia) con un sensor para el receptor TrkB y microscopía de dos fotones en tiempo real, se monitoreó la actividad del receptor TrkB en una sola espina dendrítica de neuronas piramidales del área CA1 en cultivo de neuronas hipocámpales en respuesta a la inducción de LTP estructural. En este estudio encontraron una activación rápida y sostenida del receptor TrkB (mayor a 20 minutos) que depende de la activación de los receptores NMDA, de la activación de la proteína CaMKII y de la síntesis postsináptica de BDNF (Harward et al., 2016). En este mismo orden de ideas, se ha encontrado que el BDNF regula la expresión de factores de la transcripción y proteínas de unión al ARN implicadas en el transporte y traducción del mismo (Schratt et al., 2004; Liao et al., 2007; Manadas et al., 2009; Leal et al., 2014; Panja y Bramham, 2014).

Por otra parte, se ha reportado que la respuesta celular a BDNF depende marcadamente de cómo esta neurotrofina es administrada (administración aguda vs gradual) provocando con ello una expresión diferencial de los genes Homer1 y Arc. Con relación a lo anterior se encontró en cultivo hipocámpal de neuronas que la aplicación aguda de BDNF produce una activación transitoria de los receptores TrkB, promoviendo cambios estructurales a nivel de la sinapsis, tales como la elongación de las neuritas y un alargamiento en la cabeza de la espina, mientras que la administración gradual de BDNF provoca una activación sostenida de los receptores TrkB facilitando la arborización de las neuritas y la elongación del cuello de la espina

(Ji et al., 2010). Los estudios previamente referidos nos muestran que esta neurotrofina, por medio de la activación de sus tres vías de señalización, es capaz de inducir una serie de cambios a nivel estructural en las neuronas que están comprometidas en algún proceso de plasticidad sináptica.

3.5.1.3. BDNF: transcripción y traducción génica

La mayoría de los genes que son expresados en una célula, son transcritos en el núcleo en una molécula llamada ácido ribonucleico mensajero (ARNm), que es transportado fuera del núcleo hacia el citoplasma, donde se traduce en proteína a través de los ribosomas. La función del ARNm es enviar la información para la fabricación de una proteína específica codificada en el ADN (Kandel et al., 2000). Numerosas evidencias experimentales indican que la consolidación y el mantenimiento de la memoria es un proceso dependiente tanto de síntesis de nuevas proteínas como de ARNm *de novo* (Davis y Squire, 1984; McGaugh, 2000; Dudai y Eisenberg, 2004).

Como mencionamos en un principio, la LTP al igual que la memoria, puede ser dividida en dos fases de acuerdo a su temporalidad: la fase temprana de la LTP (E-LTP) involucra la fosforilación y modificación de proteínas pre-existentes y su tráfico a la sinapsis (Malenka y Bear, 2004; Mayadevi, et al., 2012), en tanto que la fase tardía (L-LTP), requiere de la síntesis de nuevo ARNm y de proteínas, así como de la actividad de proteínas cinasas, e involucra cambios estructurales en las sinapsis (Huang et al., 1994; Mayadevi et al., 2012).

Particularmente, se ha demostrado que la LTP inducida por la administración de BDNF en la vía de las colaterales de Shaffer al área CA1 del hipocampo requiere de transcripción local de ARNm y puede ser generada de manera independiente de las proteínas y del ARNm sintetizados en el soma neuronal (Kang y Schuman, 1996). Por otra parte, se ha reportado que la inducción de LTP dependiente de BDNF en la vía de proyección denominada patrón perforante, que va de la corteza entorrinal al GD, es suprimida por la administración de actinomicina D (un inhibidor de la transcripción) cuando la microinfusión tiene lugar 1 hora o inmediatamente antes de la infusión de BDNF. La infusión de este fármaco 2 horas después de la administración de la neurotrofina no redujo el incremento en la eficiencia sináptica producido por BDNF (Messaoudi et al., 2002). Asimismo, se ha encontrado que el BDNF regula la expresión de factores de la transcripción y proteínas de unión al ARN implicadas en el transporte y traducción de éste (Schratt et al., 2004; Manadas et al., 2009; Leal et al., 2014; Panja y Bramham, 2014).

En este contexto, el empleo de fármacos que permiten inhibir la síntesis de proteínas y de ARNm resulta fundamental en el análisis de la participación de estos mecanismos moleculares en los procesos de aprendizaje y memoria, así como en las modificaciones de la eficiencia sináptica concomitantes. Entre los fármacos que inhiben el proceso de traducción, la anisomicina ha sido ampliamente utilizada debido a que es un inhibidor potente, estructuralmente específico y reversible, cuyo pico de actividad se encuentra entre los 20 y 30 minutos posteriores a su administración (Davis y Squire, 1984; Rosenblum et al., 1993).

Por su parte, entre los fármacos que inhiben el proceso de transcripción, el 5,6-dicloro-1- β -ribo furanozil benzimidazol (DRB) destaca debido a que su efecto es reversible (entre las 2 y 3 horas después de su aplicación) y su pico de actividad se ubica alrededor de los 15 min tras su infusión (Nguyen et al., 1994). Además, el DRB inhibe selectivamente a la ARN polimerasa II (ARNP II), afectando la producción de transcritos maduros de ARNm, en contraste con la actinomicina D y la α -amanitina, las cuales afectan también la síntesis de ARN de transferencia y ribosomal, puesto que interfieren con la actividad de las ARNP I y ARNP III, la α -amanitina afecta también el nivel de traducción proteínica a altas concentraciones (Clement y Wilkinson, 2000). Por su parte, la actinomicina D también produce daño cerebral y deteriora la conducta cuando se administra intraparenquimalmente (Igaz et al., 2002).

Los estudios anteriores sustentan que el BDNF es una proteína fundamental para promover la inducción y el mantenimiento de la plasticidad sináptica. Sin embargo, el papel que juega la síntesis de proteínas y de ARNm *de novo* en las modificaciones de la comunicación sináptica y la reorganización estructural de las fibras musgosas hipocampales producidos por la administración de BDNF permanece aún inexplorada.

3.6. La corteza insular y la vía gustativa

La corteza insular (CI) está localizada a lo largo de la confluencia del surco rinal y la arteria cerebral media, entre la parte posterior del lóbulo frontal y la parte superior del lóbulo temporal. La corteza insular ha sido dividida en tres regiones diferentes: la

zona granular en la parte dorsal, el área disgranular en el centro, y la zona agranular en la región ventral (**Figura 7 A y B**). El área disgranular ha sido relacionada con modalidades gustativas, mientras que la región granular está asociada con áreas corticales viscerosensoriales, y el área agranular posterior ha sido asociada con la integración multimodal y límbico-autonómica (Kosar et al., 1986; Saper, 1982; Shi y Cassell, 1998; citados por Bermúdez-Rattoni, 2014). Así, su actividad se ha visto involucrada en el procesamiento de varios paradigmas de aprendizaje, tales como prevención pasiva, tareas de reconocimiento del sabor y el condicionamiento de aversión al sabor (Bermúdez-Rattoni, et al., 2004). Varios estudios han demostrado que lesiones bilaterales de la corteza insular antes o después de la adquisición del CAS deterioran el aprendizaje o la evocación del mismo (McGowan et al., 1972), sin embargo, no parece afectar la percepción del sabor, puesto que los animales pueden discriminar entre varias concentraciones de sacarosa y cloruro de sodio.

El procesamiento de información al sabor inicia con la transducción química de un nuevo sabor en la cavidad oral, haciendo contacto con las células gustativas. Las papilas gustativas en la lengua y el paladar están inervadas por tres nervios aferentes: la cuerda del tímpano, petroso mayor superficial y glossofaríngeo. Estos nervios llevan información de los receptores gustativos al núcleo del tracto solitario (NTS), principalmente a través de los pares craneales facial (VII) y glossofaríngeo (IX), y de la laringe y faringe a través del nervio vago (X). Pruebas electrofisiológicas indican que las neuronas del NTS proyectan ipsilateralmente al núcleo posteromedial parabraqueal (NPB), y mediante el uso de técnica inmunohistoquímica se ha demostrado que las fibras gustativas llegan a la parte dorsolateral del NPB. Esta

estructura proyecta hacia el hipotálamo lateral, el núcleo del nicho de la estría terminalis, la amígdala central (CEA) y basolateral (BLA), y la zona parvocelular del núcleo ventral posteriomedial del tálamo (VPM). Este último proyecta hacia la corteza insular gustativa, una región localizada a lo largo del surco rinal, dorsal a la corteza peririnal (Yarmolinsky et al., 2009; Bermúdez-Rattoni, 2004) (**Figura 7C**).

Estudios realizados por nuestro grupo de investigación muestran que la estimulación tetánica de la amígdala basolateral induce LTP en la CI agranular en ratas (Escobar et al., 1998a). Asimismo, se demostró que la infusión de inhibidores de los receptores NMDA en la CI deteriora la adquisición del CAS (Escobar et al., 1998b; 2002). Además, se ha observado que el incremento en la activación de acetilcolina, a través de los receptores muscarínicos inicia una serie de eventos intracelulares principalmente en la CI y en la amígdala que favorecen los cambios plásticos relacionados con el trazo de memoria gustativa a largo plazo (Bermúdez-Rattoni, 2004). En un estudio reciente, usando una combinación de aproximaciones, tales como transfección de un vector viral en la CI, hibridación *in situ* para el gen *Arc* y el sistema de receptores activado exclusivamente por drogas de diseño (DREADD, por sus siglas en inglés), se demostró que en las neuronas que expresan altos niveles de CREB son reclutadas para codificar el trazo de memoria de aversión al sabor (Sano et al., 2014).

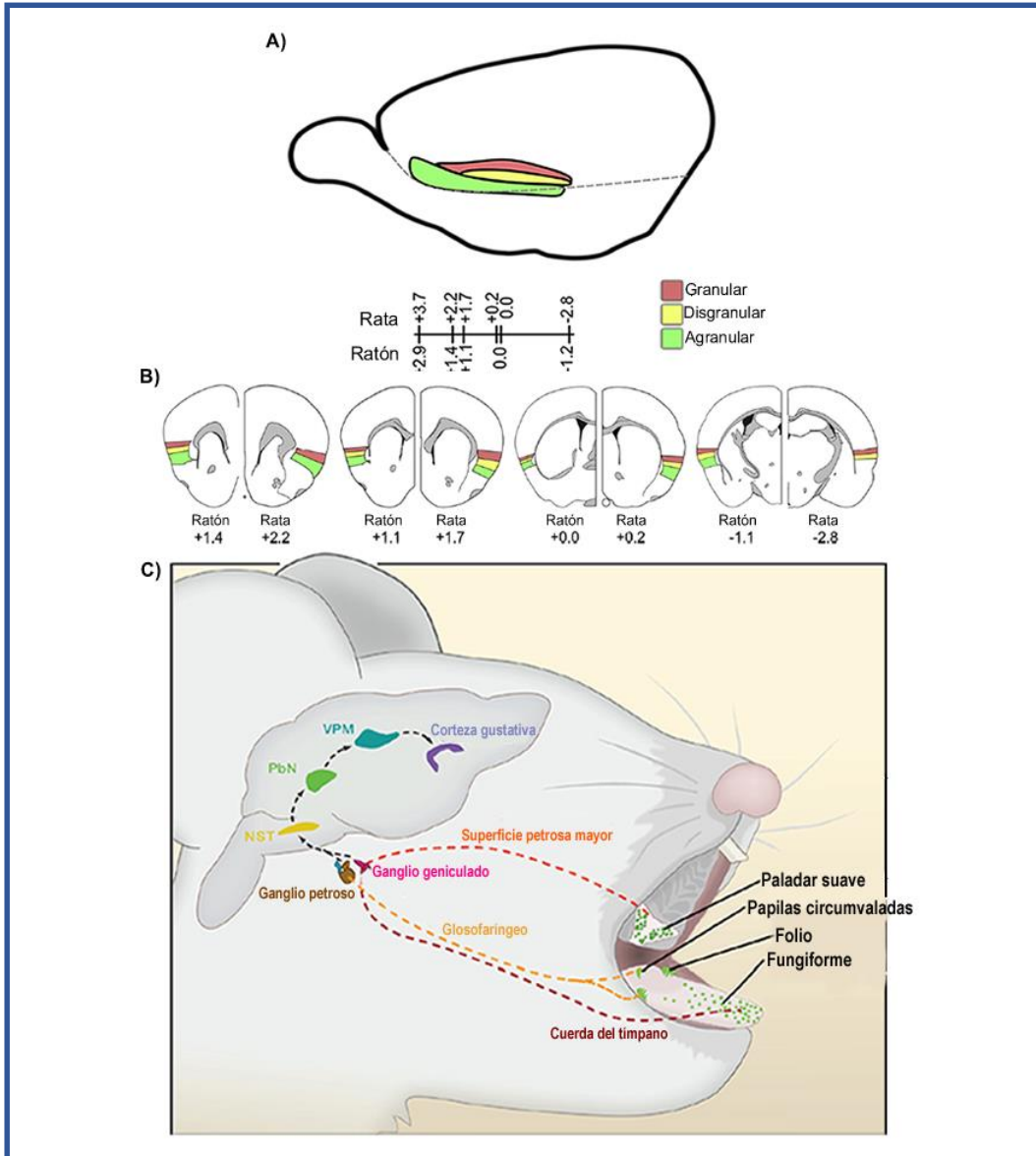


Figura 7. Anatomía de la corteza insular. A) Representación esquemática de la corteza insular (CI) en la rata y el ratón a lo largo del surco rinal mostrando la CI granular, disgranular y agranular. B) Representaciones esquemáticas de secciones coronales de ratón (izquierda) y rata (derecha) en varias secciones anteroposterior a partir de Bregma tomado como cero. C) El sabor surge de la lengua y el paladar, que son inervados por tres nervios aferentes: la cuerda del tímpano, la superficie petrosa mayor y el glosofaríngeo. Estos nervios llevan la información del sabor desde las células receptoras en la lengua al núcleo del tracto solitario (NST) en el cerebro. A partir de este núcleo, la información se transfiere a través del núcleo parabraqueal (PbN) y del núcleo ventral posteromedial del tálamo (VPM) a la corteza gustativa primaria en la ínsula (Modificado de Bermúdez-Rattoni, 2014 y Yarmolinski et al., 2009).

Las evidencias experimentales antes mencionadas sustentan que tanto la corteza insular como la amígdala son regiones interconectadas que contribuyen al establecimiento del trazo mnémico del sabor. La persistencia de este trazo implica todo un mecanismo complejo a nivel molecular, dentro del cual juegan un papel importante las neurotrofinas y en particular el BDNF.

3.6.1. El condicionamiento de aversión al sabor

Parte importante del repertorio de conductas de un animal es recordar si el alimento ingerido representa alguna amenaza para su supervivencia. Así, cuando la ingesta de un alimento es seguida de un malestar gástrico, el animal será capaz de anticipar el potencial dañino de cualquier alimento que tenga atributos similares, evitando su consumo. Este tipo de conducta ha sido denominado condicionamiento de aversión al sabor (CAS), y se ha propuesto que este condicionamiento es una especie de aprendizaje adaptativo que no sigue las reglas convencionales (Rozin y Kalat, 1971; Seligman, 1970; citados por Reilly y Schachtman, 2009). Éste es un condicionamiento asociativo donde el sabor sirve como estímulo condicionado y el malestar gástrico como estímulo incondicionado, de manera que el estímulo gustativo adquiere la capacidad de inducir una respuesta condicionada. John García, uno de los pioneros en su estudio, describió por primera vez que las ratas desarrollan aversión a una solución con sabor dulce una vez que éste es seguido de la aplicación de rayos gamma (García et al., 1955). Posteriores estudios del mismo grupo de investigación sustituyeron la aplicación de rayos gamma por administración

de cloruro de litio (LiCl) el cual produce malestar gástrico debido a la activación de los nervios vago y esplénico (García y Koellin, 1966).

Así, García y Koellin demostraron que una solución con sabor se asocia más fácilmente a la inducción de náusea que la aplicación de choques en las patas de los roedores. Estos investigadores también indicaron que el CAS presenta dos propiedades inusuales: la aversión al sabor puede ser adquirida a pesar de que haya un largo intervalo de tiempo entre ambos estímulos y el aprendizaje de la aversión fue específica para claves de sabor, reflejando una asociación selectiva; esto muestra que, en este tipo de condicionamiento, donde el estímulo condicionado es el sabor, es necesario que el estímulo aversivo sea de tipo visceral (García y Koellin, 1966). En las siguientes líneas se presentan los principios generales del CAS:

1.- Si un animal consume un alimento con un sabor particular y posteriormente sufre un malestar gástrico, en los siguientes encuentros con este sabor el animal evitará o disminuirá drásticamente su consumo (García et al., 1985).

2.- La fuerza de la aversión aprendida está directamente relacionada con la intensidad del sabor y del malestar, y está inversamente relacionada con el intervalo entre la presencia del sabor y la inducción del malestar. Este intervalo puede durar horas a diferencia de otros condicionamientos (Domjan, 1985).

3.- Los estímulos gustativos se asocian más fácilmente a estímulos gástricos (García y Koellin, 1966).

Como se observa en la literatura, este paradigma ha sido utilizado ampliamente debido a su relevancia a nivel evolutivo, puesto que la ingesta de alimento es clave para la sobrevivencia de cualquier organismo. Además, basta una sola exposición a los estímulos implicados para que el condicionamiento tenga lugar. Así también, dado que la vía anatómica a través de la cual la información gustativa es procesada está bien descrita, se pueden estudiar de mejor manera los procesos tanto funcionales, estructurales y moleculares implicados en este tipo de memoria.

3.6.2. Plasticidad sináptica en la corteza gustativa regulada por BDNF

Se ha descrito que la memoria es inicialmente almacenada en la red neuronal hipocampo-corteza entorrinal y que con el paso del tiempo esta información es transferida a la neocorteza para un almacenamiento permanente (Squire, 1986; Nadel, Moscovich, 1997; McClelland, 2013; citados por Kitamura et al., 2017). En un estudio reciente, el grupo de investigación del Dr. Susumu Tonegawa reveló que los engramas neocorticales (críticos para la memoria remota) son generados de manera temprana durante el aprendizaje inicial y que después, con el paso del tiempo, éstos se vuelven funcionalmente maduros; mientras que los engramas hipocampales se tornan silentes (Kitamura et al., 2017). Como se mencionó previamente, además del hipocampo, otra estructura en la cual se ha observado una alta expresión de BDNF y de su receptor TrkB, es la corteza insular (Conner et al., 1997). En concordancia, se sugiere que el BDNF es un producto clave para la persistencia de la memoria.

Existe una vasta evidencia acerca de cómo esta neurotrofina modula el trazomnémico en la corteza insular. Al respecto, se ha demostrado que la administración aguda de BDNF induce un incremento en la eficiencia sináptica en la vía de proyección Bla-CI de ratas adultas *in vivo* (Escobar et al., 2003). Asimismo, reportes experimentales indican que esta neurotrofina es capaz de rescatar la fase tardía de la LTP, así como la memoria de largo plazo una vez que la síntesis de proteínas ha sido inhibida por la aplicación de anisomicina, incluso en diferentes ventanas temporales después de la consolidación de la memoria del CAS (Pang et al., 2004; Moguel-González et al., 2008; Martínez-Moreno et al., 2011). Por otra parte, se ha descrito que la infusión de BDNF en la corteza insular de ratas adultas previo al entrenamiento en la tarea de condicionamiento de aversión al sabor fortalece la retención de esta información (Castillo et al., 2006); mientras que la administración de BDNF antes de la primera sesión de extinción del CAS aceleran el proceso de extinción (Rodríguez-Serrano et al., 2014). Esto sugiere que el BDNF es un producto clave para la memoria, incluso en áreas neocorticales, lo cual propone que juega un papel crítico en la plasticidad sináptica de largo plazo (Bekinschtein et al., 2007; Castillo et al, 2006).

3.7. Formación hipocampal

El hipocampo es sin lugar a duda una estructura filogenéticamente antigua sustancialmente implicada en el procesamiento del aprendizaje y la memoria. Se localiza en la profundidad del lóbulo temporal medial debajo de la neocorteza, el cual

recibe información de casi todas las áreas de asociación a través de las cortezas perirrinal y parahipocampal y finalmente a través de la corteza entorrinal (Van Strien et al., 2009; citado por Bartsch y Wulff, 2015). Anatómicamente, el hipocampo presenta tres subdivisiones, las áreas CA3, CA2 y CA1. Las otras regiones de la formación hipocampal incluyen al giro dentado, el subículum, el presubículum, el parasubículum y la corteza entorrinal. El área entre la región CA3 y el giro dentado se denomina hilus. La organización de las conexiones sinápticas en esta estructura consta de un circuito básico llamado circuito trisináptico. La mayoría de la información que proviene de la neocorteza y que llega al hipocampo es enviada por medio de los axones que proyectan a las capas superficiales de la corteza entorrinal (llamada vía perforante) y llegan a las células granulares del giro dentado (GD), estableciendo la primera sinapsis. Posteriormente los axones de las células granulares envían proyecciones (llamadas fibras musgosas) que arriban a las dendritas apicales de las células piramidales en el área CA3, generando la segunda sinapsis. Finalmente, los axones de las células piramidales en el área CA3 envían proyecciones (llamadas colaterales de Schaffer) que llegan al área CA1, estableciendo la tercera sinapsis (Andersen, 2007).

Tanto el hipocampo como el giro dentado constituyen un tejido neuronal que consta de tres estratos laminares denominados arquicorteza. Dichas láminas son la polimórfica (estrato oriens), la piramidal (estrato piramidal) y la molecular (estrato radiado y estrato lagunoso-molecular) (Fernández-Espejo, 1996) (**Figura 8**).

A nivel conductual, estudios de imagenología volumétrica y funcional han revelado un papel diferencial de las subregiones hipocampales en los procesos de

aprendizaje y memoria, sugiriendo que el área CA3 y el giro dentado están implicados en los procesos de separación de patrones, codificación de la memoria y en la evocación temprana; mientras que el área CA1 está implicada en la evocación tardía, consolidación, codificación espacial, memoria autobiográfica y de reconocimiento (Bakker et al., 2008; Suthana et al., 2009; Mueller et al., 2011; Bonnici et al., 2012, 2013; Deuker et al., 2014; citados por Bartsch y Wulff, 2015).

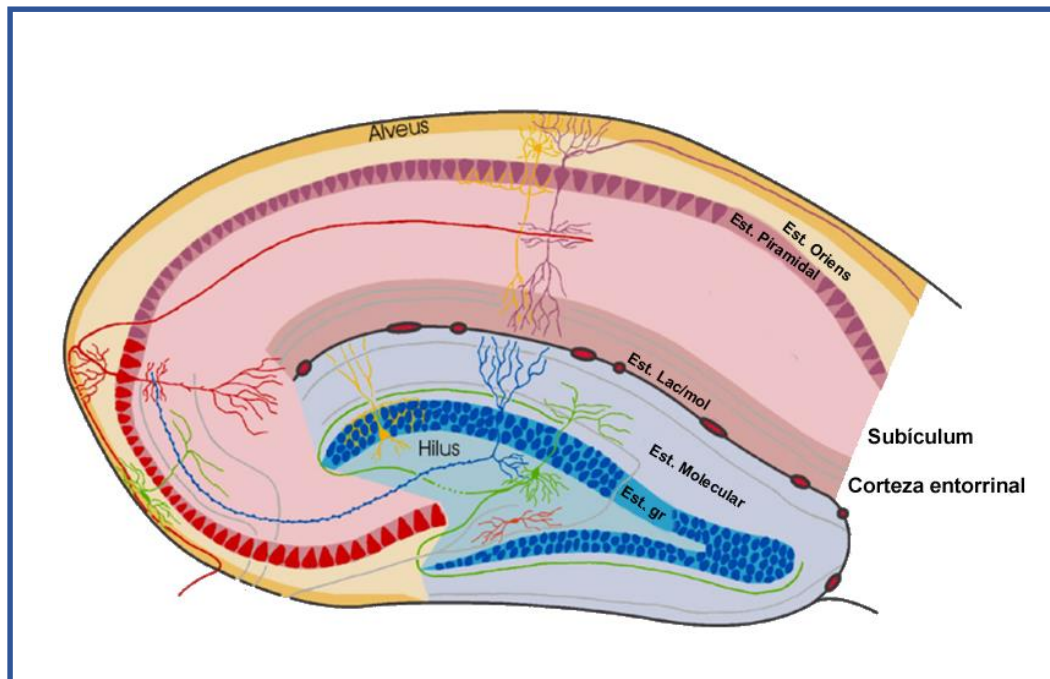


Figura 8. Subdivisión anatómica de la formación hipocámpica y su estructura laminar. Diagrama que muestra los estratos hipocámpicos: estrato oriens (Est. Oriens), estrato piramidal (Est. Piramidal), estrato lagunoso-molecular (Est. Lac/mol), estrato molecular (Est. Molecular), estrato granular (Est. gr.). (Modificado de: [Veterinar-Anatomisches Institut, http://anatomie.vetmed.uni-leipzig.de](http://anatomie.vetmed.uni-leipzig.de)).

Las fibras musgosas (FM) son uno de los subsistemas dentro de las conexiones sinápticas que se establecen en la formación hipocámpica, constituyen un modelo importante para el estudio de la plasticidad sináptica debido a su gran susceptibilidad para experimentar modificaciones funcionales y anatómicas. Como se mencionó

previamente, las FM amielínicas (axones de las células granulares del GD) viajan a través del *hilus*, donde se ramifican hacia la región CA3 del hipocampo, donde como un denso paquete axonal, se extienden paralelamente a la capa de células piramidales estableciendo dos tipos de proyecciones: una proyección al haz suprapiramidal (SP-FM) en el estrato lucido y otra proyección intra e infrapiramidal (IIP-FM) localizada principalmente en el stratum oriens (Witter y Amaral, 2004; citado por Wiera y Mozrzymas, 2015). Cada axón de las fibras forma tres tipos de terminales presinápticas con diferentes características morfológicas y funcionales: 1) hacia las células piramidales a través de los botones gigantes, 2) con las interneuronas locales a través de los filopodios y 3) las sinapsis en passant. Los axones de las FM también forman sinapsis excitatorias con las células musgosas (mossy cells) que propagan retrógradamente hacia las células granulares. Adicionalmente, las FM directamente o bien a través de las células musgosas excitan a las interneuronas positivas a parvalbúmina (basket cells) que proporcionan una inhibición retrógrada hacia las células granulares en distintas láminas a través del eje septo-hipocampal (Jinde et al., 2013; Wiera y Mozrzymas, 2015) (**Figura 9**). Los botones sinápticos gigantes de las fibras musgosas (3-10 μm de diámetro) establecen contactos con las células musgosas (7-12 contactos por axón) y con las dendritas proximales de las células piramidales del área CA3 (proyección FM-CP, 11-15 botones por axón) (Acsády et al., 1998). La proyección de las fibras musgosas se restringe a la región CA3 en ratas y ratones (Amaral, 1979). Se considera que esta vía de proyección está implicada de manera importante en funciones cognitivas tales como la detección de la novedad, completamiento de patrones y parcialmente en la

separación de patrones (Yassa y Stark, 2011; Kesner, 2013; Wagatsuma, et al., 2018).

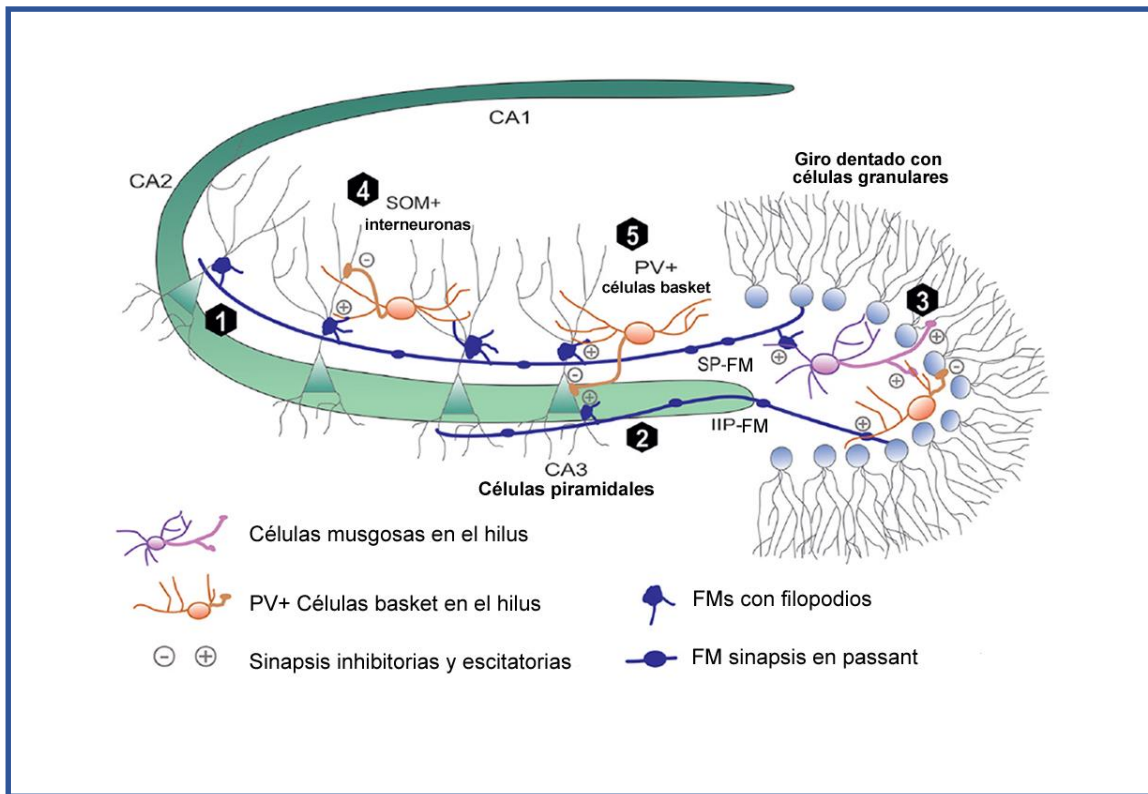


Figura 9. Proyección de las fibras musgosas (FM) hipocampales. La proyección de las fibras musgosas consta de axones procedentes de las células granulares del giro dentado. Los axones de las fibras musgosas proyectan hacia el haz supra piramidal (SP-FM) en el estrato lucido (1), así como hacia la proyección intra e infra piramidal (IIP-FM) localizada en el estrato oriens (2). En el área CA3 y el hilus establecen tres regiones sinápticas: con las células piramidales a través de los botones musgosos gigantes, con las interneuronas locales a través de los filopodios y las sinapsis en passant. Y finalmente con el hilus (3), donde los axones de las fibras musgosas establecen sinapsis excitatorias con las células musgosas que propagan retrógradamente a las células granulares. Adicionalmente las FM, directamente o a través de las células musgosas, excitan a las interneuronas locales positivas a parvalbúmina (células basket) que proporcionan una inhibición retrógrada a las células granulares en distintas láminas a través del eje septo-hipocampal. Las FM en el área CA3 excitan a interneuronas locales que son responsables de la inhibición de las células piramidales del área CA3, las cuales hacen sinapsis en el (5) soma, o en el (4) árbol dendrítico (Modificado de Wiera y Mozrzymas, 2015).

Estas fibras se caracterizan por poseer un alto contenido de péptidos opioides que funcionan como moduladores de esta región (Escobar et al., 1997; Zhang y Houser, 1999; Terman et al., 2000), así como por presentar un alto contenido de zinc en sus botones sinápticos, el cual co-libera con glutamato produciendo activación de diversos canales y receptores iónicos (Frederickson et al., 2005). La neurotransmisión excitatoria en las sinapsis de las fibras musgosas depende de la liberación de glutamato y de la activación postsináptica de receptores a glutamato. Dentro de los canales y receptores que participan en la inducción de la LTP en esta vía se encuentran los receptores de tipo AMPA y kainato, y los canales de calcio dependientes de voltaje, específicamente de tipo R con subunidad α_{1E} - (Nicoll y Schmitz, 2005).

Los eventos moleculares que subyacen a la LTP en la vía que va del GD al área CA3 del hipocampo no han sido clarificados por completo. Sin embargo, hoy en día se sabe que la LTP inducida en esta vía presenta algunas particularidades. Por ejemplo, se ha observado que el incremento en la probabilidad de liberación del neurotransmisor glutamato es esencial para inducir el incremento en la transmisión sináptica en esta vía de comunicación. Asimismo, se ha demostrado que la inducción clásica de la LTP en esta vía es independiente de la activación de los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), pues la administración de fármacos antagonistas de este receptor no impide la inducción de la LTP (Harris y Cotman, 1986). La expresión de esta forma de LTP depende de mecanismos presinápticos y de la participación de la proteína cinasa A (PKA) (López-García et al., 1996). Asimismo, se ha observado que la administración de un potente agonista de los receptores metabotrópicos de

glutamato del grupo II (mGluRII), el DCG-IV (2S,2'R,3'R)-2-(2',3'-Dicarboxycyclopropyl glycine, por sus siglas en inglés), reduce los potenciales de campo, bloquea la transmisión sináptica y la señalización de calcio presináptica (Nicoll y Schmitz, 2005). Se ha reportado que el efecto que produce la aplicación de DCG-IV se debe a que la activación de los receptores mGluRII reduce la liberación presináptica de zinc, así como la transmisión sináptica (Matias et al., 2014).

Recientemente Galván y colaboradores demostraron a través de un estudio *in vitro*, que la inducción de la LTP de la vía de proyección de las colaterales recurrentes (CR)-CA3, presenta diferencias en cuanto a los mecanismos moleculares que la sustentan en relación a la LTP inducida en la vía de proyección FM-CA3. De acuerdo con estos autores, la LTP generada en la vía CR-CA3 requiere de la activación de la proteína cinasa II dependiente de calcio calmodulina (CaMKII), mientras que la LTP generada en la vía FM-CA3 implica de manera importante a la activación de PKA, y ambos tipos de LTP tienen como efector molecular común la activación de PKC (Galván et al., 2015).

Asimismo, se ha reportado que aunada a la inducción “clásica” de LTP en la vía de las FM, existe otro mecanismo de inducción de potenciación sináptica caracterizado por un incremento selectivo de la transmisión mediada por los receptores de tipo NMDA. Este tipo de potenciación requiere la coactivación de los receptores NMDA y de los receptores metabotrópicos de glutamato tipo 5 (mGlu5), así como de una elevación de calcio postsináptica (Kwon y Castillo, 2008).

Hoy en día se sabe que el zinc puede modular la plasticidad sináptica en esta vía. Por ejemplo, la administración de quelantes de zinc, así como una dieta crónica deficiente de este metal puede impedir la inducción de la LTP (Li et al., 2001). La entrada de zinc procedente del espacio extracelular a la neurona postsináptica puede efectuarse a través de los receptores AMPA o kainato y por los canales de calcio dependientes de voltaje (Lu et al., 2005). El zinc puede activar a los receptores de tirocina cinasa TrkB incrementando la actividad de la familia de cinasas Src por un mecanismo independiente al de las neurotrofinas (Huang et al., 2008).

3.7.1. Mecanismos de transcripción y traducción en la LTP de las FM

Entre los procesos de transcripción y traducción asociados a la inducción y mantenimiento de la LTP en la vía de las fibras musgosas, en un estudio llevado a cabo por Huang y colaboradores se reportó que la inhibición de síntesis de proteínas (por administración de anisomicina) o la inhibición de ARN (por la aplicación de actinomicina-D) producen una reducción de la fase tardía de la LTP generada en la vía de las FM en rebanadas de hipocampo *in vitro* (Huang et al., 1994). De forma similar, en otro estudio se reportó que la inhibición de síntesis de proteínas (por administración de anisomicina o cicloheximida) en la región CA3 del hipocampo deteriora la inducción de la LTP en esta vía de comunicación *in vivo* (Barea-Rodríguez et al., 2000). Por otra parte, Calixto y colaboradores (2003), demostraron a través de un estudio llevado a cabo en rebanadas de hipocampo que la aplicación de dos inhibidores de síntesis de proteínas 1 hora después de la inducción de la LTP

en la vía de las fibras musgosas produce un decremento en la potenciación de esta vía. Asimismo, la administración de actinomicina-D previa a la estimulación de alta frecuencia en dicha vía produce un decaimiento en la potenciación, sin embargo, la administración de este fármaco 45 min después de la inducción de la LTP no produjo decaimiento en la potenciación (Calixto et al., 2003). Recientemente se ha reportado que la administración de fármacos que inhiben tanto la síntesis de proteínas o la síntesis de ARNm interfiere con las fases temprana y tardía de la LTP en la vía de las fibras musgosas inducida por trenes de estimulación de alta frecuencia *in vivo* (Hagena y Manahan-Vaughan, 2013).

3.7.2. Plasticidad sináptica en las FM regulada por BDNF

Como ya mencionamos en líneas anteriores, el BDNF se encuentra distribuido en numerosas estructuras a lo largo del SNC. Una de las estructuras que presenta altos niveles de expresión de esta neurotrofina es el hipocampo, particularmente en el DG y en el área CA3 del hipocampo (Conner et al., 1997; Drake et al., 1999). Este hecho nos habla de la importancia de la presencia de BDNF para la regulación de los cambios en las propiedades eléctricas y en la reorganización estructural en las sinapsis.

En una serie de estudios, se ha comprobado que la modificación funcional que involucra la vía de proyección de las FM (ya sea al resolver una tarea de memoria espacial o por la inducción de LTP) está asociada a una reorganización del área CA3 del hipocampo, la cual se observa a partir del séptimo día y persiste hasta por 30

días después del entrenamiento o tratamiento (Ramírez-Amaya et al., 2001; Rekart et al., 2007; Gómez-Palacio, Escobar, 2008; Ramos-Languren et al., 2013; Zhang et al., 2016). Por otra parte, Schildt y colaboradores demostraron que la interferencia de la señalización BDNF/TrkB tanto crónica (por medio de ratones BDNF^{+/-}) como aguda (por la aplicación de un inhibidor del receptor TrkB, o bien por la administración de un secuestrador selectivo para BDNF) interfiere con la inducción de la LTP en la vía de las fibras musgosas (Schildt et al., 2013).

En este mismo orden de ideas, estudios llevados a cabo por nuestro grupo de investigación, han revelado que la infusión intrahipocámpal aguda de BDNF produce un incremento en la eficacia sináptica en la proyección del giro dentado al CA3, y este efecto es revertido al administrar un inhibidor para el receptor TrkB ocasionando asimismo cambios morfológicos a nivel presináptico en la vía de las fibras musgosas (Gómez-Palacio-Schjetnan y Escobar, 2008) (**Figura 6**).

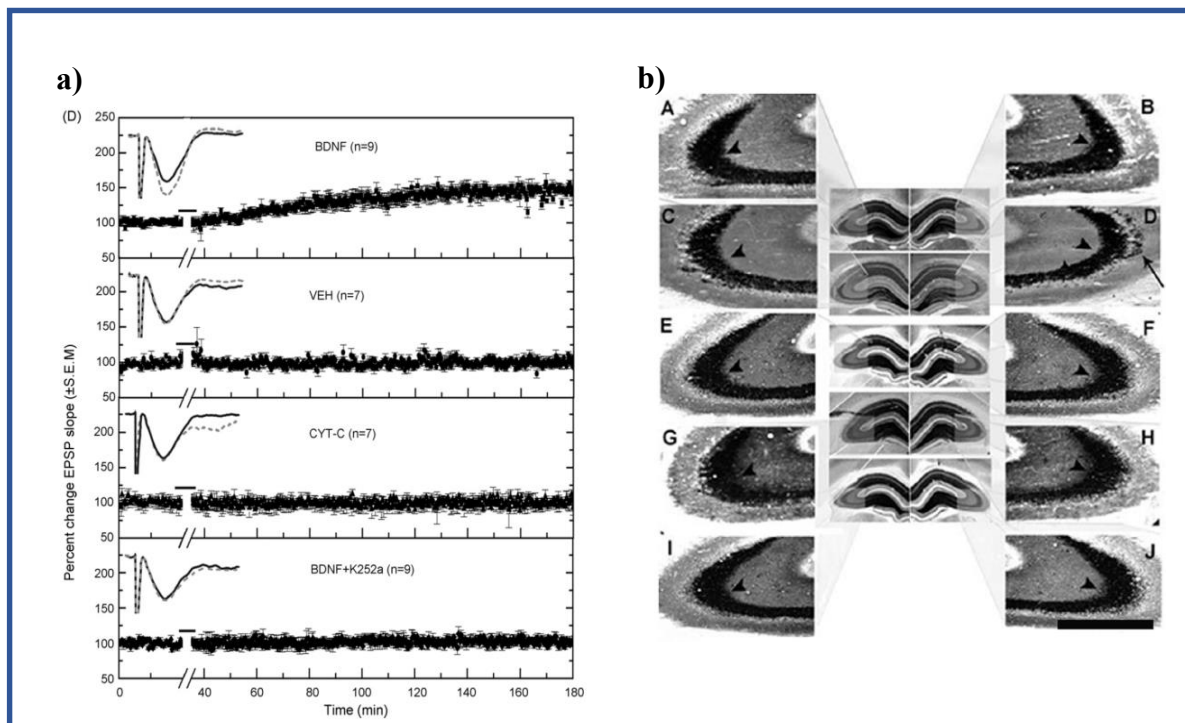


Figura 6. El BDNF incrementa la eficiencia sináptica y provoca una reorganización estructural en la vía de las fibras musgosas hipocampales. a) La gráfica muestra la media \pm el error estándar del porcentaje de la pendiente de los potenciales post-sinápticos excitatorios (EPSPs) con respecto a la línea base, registrados en la vía fibras musgosas-CA3. La gráfica superior muestra que después de la infusión de BDNF los valores de la pendiente de los EPSPs incrementan significativamente respecto a la línea base. Por otra parte, muestra que la administración de K252a revierte el efecto producido por la administración de la neurotrofina. b) Las fotografías muestran secciones coronales de los hipocampos dorsales de los grupos control intacto (A y B), BDNF (C y D), vehículo (E y F), citocromo C (G y H) y BDNF+K252a (I y J) que muestran la distribución de las fibras musgosas teñidas con Timm. La infusión de BDNF produjo un incremento bilateral de los botones de las fibras musgosas hipocampales, con un aumento preponderantemente ipsilateral al sitio de infusión, en comparación con los grupos restantes (Gómez-Palacio-Schjetnan y Escobar, 2008).

El estudio de la vía de proyección GD-CA3 representa un importante escaparate para el análisis de fenómenos plásticos, debido a su alta susceptibilidad de presentar modificaciones tanto de tipo funcional como anatómico.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como hemos descrito hasta ahora, la literatura referida sustenta el efecto modulador de la plasticidad sináptica ejercido por el BDNF en estructuras tanto neo como paleocorticales. La infusión de esta neurotrofina en la CI nos permite analizar su efecto sobre la eficiencia de la comunicación sináptica, así como sobre la expresión conductual de la misma. En tanto que en las FM nos permite analizar tanto las modificaciones en la eficiencia sináptica como la reorganización estructural concomitante. Estudios previos de nuestro laboratorio muestran que la administración aguda de BDNF en la corteza insular es capaz de revertir las deficiencias en la memoria de aversión al sabor producidas por la inhibición de síntesis de proteínas (Gómez-Palacio-Schjetnan y Escobar, 2008). Asimismo, investigaciones recientes muestran que la señalización BDNF-TrkB es capaz de mediar el incremento de la memoria (Ma et al., 2011; Revest et al., 2014). Sin embargo, la capacidad del BDNF para fortalecer las memorias aversivas cuando esta neurotrofina es administrada directamente en áreas neocorticales permanece aún inexplorada.

Asimismo, estudios previos de nuestro grupo de investigación revelan que el BDNF genera incrementos en la eficiencia sináptica que son acompañados por cambios estructurales en la vía de las fibras musgosas, y que este fenómeno está asociado a la activación de los receptores Trk. Sin embargo, el papel que juega la síntesis de proteínas y de ARNm *de novo* en este subsistema hipocampal, que como hemos descrito representa un importante escaparate para el estudio de fenómenos

plásticos, debido a su alta susceptibilidad de experimentar modificaciones de tipo funcional y anatómico, permanece aún inexplorado.

5. OBJETIVO GENERAL

Analizar la participación del BDNF en la plasticidad sináptica en áreas neo y paleocorticales del sistema nervioso central adulto. Evaluando en primer término la capacidad de esta neurotrofina para fortalecer la memoria de aversión a los sabores tras su administración en la corteza insular. Asimismo, analizamos los efectos de la inhibición de la traducción y la transcripción génica sobre las modificaciones de la eficiencia sináptica y la reorganización morfológica de las fibras musgosas hipocampales producidas por la administración aguda de BDNF en el área CA3 del hipocampo.

A fin de cumplir con estos objetivos, el presente proyecto de investigación consta de dos fases experimentales.

5.1. Objetivos particulares. Fase 1:

- Analizar el efecto de la administración aguda de BDNF en la corteza insular en una condición de aversión al sabor débil.

- Evaluar si el efecto de BDNF producido bajo condiciones de CAS débil depende de la activación de los receptores Trk.

5.2. Objetivos particulares. Fase 2:

- Analizar el efecto de la inhibición de la síntesis de nuevas proteínas sobre el incremento de la eficiencia sináptica producida por la administración aguda de BDNF en la vía de comunicación que va del GD al área CA3 del hipocampo (GD-CA3) *in vivo*, a través de la microinfusión de anisomicina.
- Analizar el efecto de la inhibición de la síntesis de proteínas sobre la reorganización estructural de las fibras musgosas hipocampales producida por la administración aguda de BDNF, a través de la microinfusión de anisomicina.
- Analizar el efecto de la inhibición de la síntesis de ARNm sobre el incremento de la eficiencia sináptica producida por la administración aguda de BDNF en la vía de comunicación que va del GD al área CA3 del hipocampo (GD-CA3) *in vivo*, a través de la microinfusión de DRB.
- Analizar el efecto de la inhibición de la síntesis de ARNm sobre la reorganización estructural de las fibras musgosas hipocampales producida por la administración aguda de BDNF *in vivo*, a través de la microinfusión de DRB.

6. METODOLOGÍA GENERAL

En el presente proyecto se emplearon ratas machos de la cepa Wistar con pesos de entre 360 a 380 g, los cuales fueron alojados en cajas individuales de policarbonato,

en un ciclo de luz-obscuridad 12h/12h a una temperatura promedio de 21°C, con comida y agua ad libitum, excepto en las fases experimentales que indican lo contrario. Los experimentos fueron llevados a cabo de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana y con la aprobación del Comité Local de Cuidado Animal.

6.1. Procedimiento experimental. Fase 1

6.1.1. Cirugía estereotáxica y microinfusión

El procedimiento quirúrgico de los sujetos se llevó a cabo usando las técnicas estereotáxicas convencionales y consistió en la implantación bilateral de cánulas guía de acero inoxidable, calibre 30 bajo el efecto del anestésico pentobarbital (Nembutal) aplicado en dosis de 50 mg/kg de peso corporal vía intraperitoneal.

Las coordenadas empleadas para la implantación de cánulas fueron: anteroposterior (AP)= +1.2 mm; medio-lateral (ML)= ± 5.5 mm; dorsoventral (DV)= -3mm (Paxinos y Watson, 2013). El extremo de cada una de las guías cánula fue colocada 5 mm por encima de la corteza insular. Ambas cánulas fueron fijadas al cráneo usando acrílico dental de secado rápido. Un estilete de alambre de acero inoxidable fue colocado al interior de las cánulas con la finalidad de proteger su luz de obstrucciones con material orgánico durante el periodo de entrenamiento. Para todos los grupos canulados, las microinyecciones fueron hechas a través de microinyectores consistentes en agujas dentales de calibre 30. El microinyector fue introducido en la cánula, previa remoción del estilete, y se extendió 5 mm por debajo

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

6.1.2. Entrenamiento en el CAS

Tras la implantación bilateral de cánulas, los animales recibieron administración tópica de un medicamento bactericida (pomada Furacin, Nitrofurazol 2mg/g ®) para evitar infecciones dérmicas, el cual fue administrado una vez al día durante el periodo de recuperación posoperatorio que fue de una semana. Al cabo de este periodo se procedió al entrenamiento en la tarea de condicionamiento de aversión al sabor (CAS). Veinticuatro horas antes del entrenamiento, los animales fueron privados de agua. Posteriormente se les entrenó a beber agua dos veces al día (10:00 y 18:00 horas) durante 10 minutos para cada sesión de entrenamiento en un periodo de tres días durante los cuales se estableció la línea base de consumo. El día de la adquisición, los animales fueron privados de alimento y se sustituyó el agua por un sabor novedoso (solución sacarina al 0.1%; Sigma, WI); 10 minutos después, los animales recibieron una dosis intraperitoneal de cloruro de litio (LiCl 0.1M o 0.2M,

dependiendo la condición del grupo experimental; 9.37 ml/kg) con la finalidad de inducir un malestar gástrico fuerte o débil, respectivamente. Después de la sesión de adquisición se restableció el consumo de la línea base de agua durante 3 días. Durante la prueba de aversión el agua fue sustituida por sacarina (0.1 %). La disminución del consumo de sacarina durante la prueba de aversión comparada con el consumo durante la adquisición fue usada como parámetro comparativo de la fuerza aversiva del CAS (**Figura 10**).

6.1.3. Histoquímica de Nissl

Una vez concluida la fase conductual de los experimentos, los animales fueron analizados histoquímicamente con el fin de observar la ubicación exacta de las cánulas. Para este fin, fueron sacrificados mediante una sobredosis de anestésico pentobarbital, procediendo así a la perfusión intracardial, la cual se efectuó con 400 ml de solución fijadora (paraformaldehído 4 %; glutaraldehído 0.2%) en amortiguador de fosfatos 0.1M/pH7.4. Los cerebros fueron extraídos y almacenados para su post-fijación durante 30 minutos, después fueron transferidos a una solución de sucrosa al 30% en PBS al 0.1M (pH 7.4) en la cual se mantuvieron a 4°C durante 48 hrs. Posteriormente, secciones coronales de 40 μ m fueron colectadas en amortiguador de fosfatos tras su obtención por micrótomo de congelación (LEICA RM 2000R). Las muestras fueron teñidas con violeta de cresilo y examinadas en un microscopio de luz, con el fin de verificar la posición exacta de las cánulas y microinyectores.

6.1.4. Diseño experimental. Fase 1

En primera instancia, evaluamos el efecto de dos concentraciones de LiCl seleccionadas previamente (0.1 M y 0.2 M) con la finalidad de inducir dos diferentes condiciones de aversión al sabor: CAS débil y fuerte respectivamente, de manera que los grupos se dividieron de la siguiente forma:

- Grupo CAS débil (CASd): Que fue entrenado en la tarea de CAS y el día de la adquisición recibió una dosis intraperitoneal de LiCl de 0.1 M (Miranda et al., 2008).
- Grupo CAS fuerte (CASf): Que fue entrenado en la tarea de CAS y el día de la adquisición recibió una dosis intraperitoneal de LiCl de 0.2 M (Moguel-González et al., 2008; Martínez-Moreno et al., 2011).

Posteriormente, con el fin de evaluar el efecto de la microinfusión de BDNF en la corteza insular sobre la memoria de un CAS débil, los animales fueron divididos en los siguientes grupos experimentales:

- Grupo CAS débil+ BDNF (CASd + BDNF): que recibió el mismo tratamiento que el grupo CAS débil seguido inmediatamente de una microinfusión de BDNF en una concentración capaz de inducir un incremento en la eficiencia sináptica en la vía de proyección amígdala basolateral-CI (2 µg/2 µl por sitio; 1 µl/min; Alomon Labs) (Rodríguez-Serrano et al., 2014).
- Grupo CAS débil + PBS (CASd + PBS): que, bajo las mismas condiciones que el grupo CASd + BDNF recibió una microinfusión intracortical de PBS (2µl por sitio; 1 µl/min).

- Grupo CAS débil + BDNF + K252a (CASd + BDNF + K): que bajo las mismas condiciones que el grupo CASd + BDNF recibió una microinfusión intracortical de BDNF en combinación con K252a, un inhibidor de los receptores Trk ($2 \mu\text{g}$ de BDNF/ $2 \mu\text{l}$ de K252a, $20 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{l}/\text{min}$; Alomon Labs) (**Figura 10**).

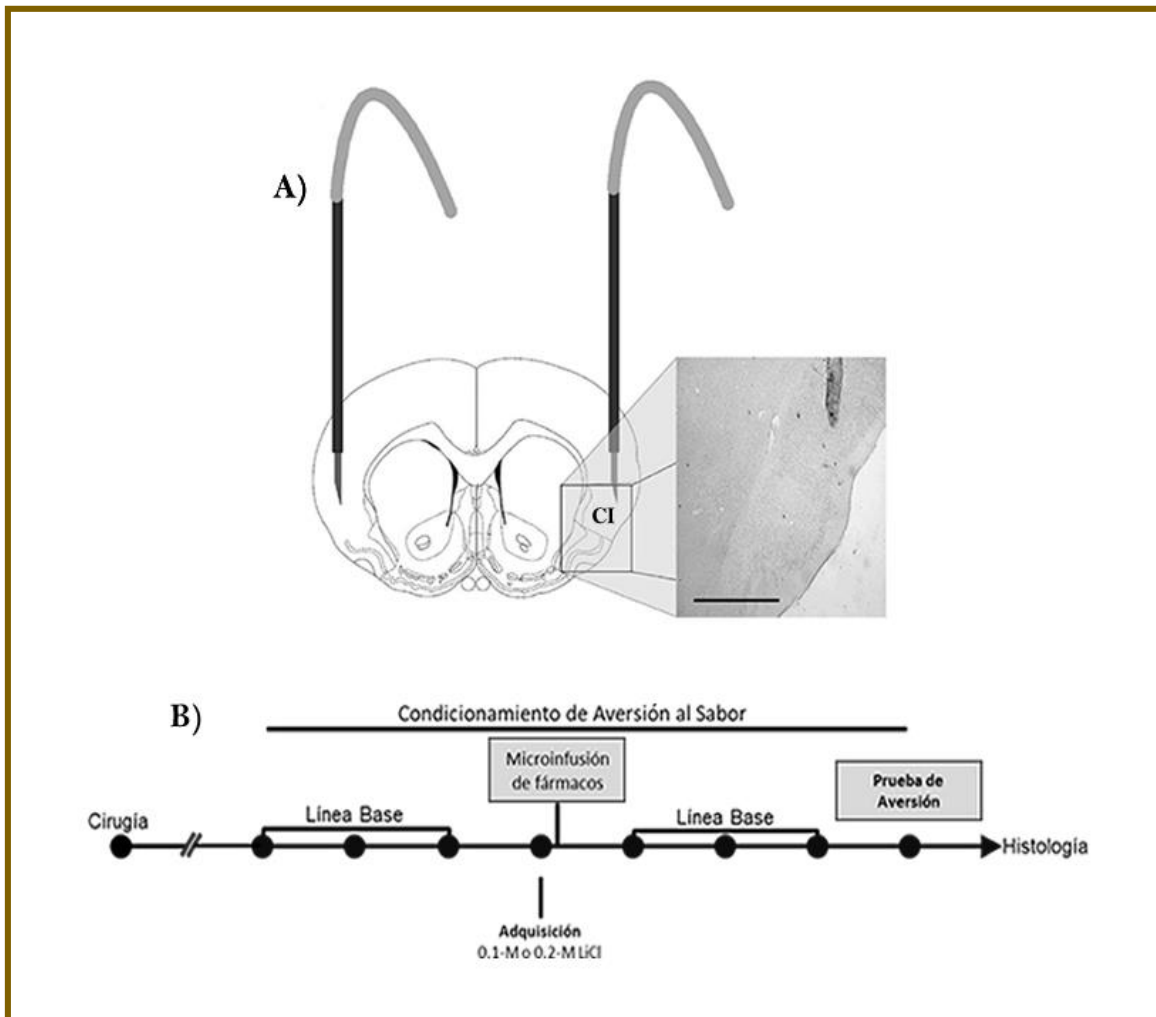


Figura 10. Representación esquemática del procedimiento experimental para la fase 1. A) Representación de la implantación bilateral de cánulas y la ubicación del microinyector en una rebanada de corte coronal que muestra la ubicación del microinyector. B) Diagrama del procedimiento experimental. Abreviaciones: IC: corteza insular; LiCl: cloruro de litio; escala de la barra: 1mm.

6.2. Procedimiento experimental. Fase 2

6.2.1. Procedimiento electrofisiológico

Durante los procedimientos electrofisiológicos, los animales fueron anestesiados con pentobarbital (50 mg/kg. i.p.), suministrando inyecciones suplementarias del mismo (25 mg/kg) a intervalos de 1 h a fin de mantener los niveles quirúrgicos de anestesia. Con el fin de analizar la participación del BDNF en las expresiones de plasticidad antes mencionadas, se efectuaron registros electrofisiológicos *in vivo* en las fibras musgosas hipocampales. Brevemente, las respuestas fueron registradas utilizando un electrodo monopolar de infusión colocado en el estrato lúcido, en la capa suprapiramidal del área CA3 del hipocampo dorsal (**Figura 12A**), siguiendo las coordenadas estereotáxicas de: AP -2.9 mm; ML +2.2 mm; DV -3.0 mm (Paxinos y Watson, 2013). Los electrodos de registro/infusión fueron construidos con una cánula guía de calibre 33 de acero inoxidable cubierta con un aislante, conectado a un cable de acero inoxidable cubierto con teflón (0.005", Medwire, Chicago IL). Este electrodo se acopló en su parte superior a una manguera de polietileno acoplada a su vez a una jeringa Hamilton de 10 µl comandada por una bomba de microinfusión. Las respuestas fueron evocadas a través de la estimulación directa del giro dentado, empleando un electrodo bipolar de acero inoxidable (diámetro 0.005") colocado en las siguientes coordenadas estereotáxicas: AP -3.5 mm; ML -2.0 mm; DV -3.1 mm (Paxinos y Watson, 2013; **Figura 12A**). La estimulación (pulsos monofásicos de 20-40 µA y 0.1-0.25 ms de duración) fue suministrada por medio de un estimulador Grass S48. Las respuestas evocadas fueron amplificadas utilizando un amplificador

Grass P5. La señal fue digitalizada para su almacenamiento y análisis en una microcomputadora provista del software BrainWave (Datawave Co.). Las respuestas evocadas de las fibras musgosas fueron medidas obteniendo la pendiente de los potenciales postsinápticos excitatorios (PPSE) de campo medidos 1-3 milisegundos después del comienzo de los PPSE. Se tomó una línea base de 20 minutos evocando respuestas cada 20 segundos, después de los cuales se administraron los fármacos: anisomicina o DRB. Quince minutos después se realizó la infusión de BDNF o PBS (del inglés phosphate-buffered saline) y el registro post-infusión continuó durante 4 horas.

El agonista del receptor metabotrópico de glutamato tipo II, (del inglés 2S,1'R;2'R,3'R)-2-(2,3-dicarboxycyclopropyl-glicine (*DCG-IV*); 0.5 μ l a una concentración de 5 μ M; 0.1 μ l/min) fue utilizado al final del registro electrofisiológico con el fin de verificar que la señal obtenida haya sido en efecto generada por las fibras musgosas hipocampales (Yoshino et al., 1996).

6.2.2. Técnica histoquímica de Timm

La técnica histoquímica de Timm para la detección de metales pesados consiste en la reducción de metales pesados libres con sulfuro de sodio, cuyo producto se combina posteriormente con nitrato de plata y se somete a un proceso de revelado análogo al fotográfico, lo que conduce a la formación de plata metálica que puede ser visualizada. Los animales son perfundidos transcárdialmente con 500 ml de una solución acuosa de sulfuro de sodio al 0.4%, seguida de 500 ml de una solución de

paraformaldehído al 1% y glutaraldehído al 1.25%. Posteriormente los cerebros son extraídos y para una crioprotección se dejan en una solución fijadora conteniendo 30% de sacarosa. Al cabo de dos días los cerebros son cortados por congelación en secciones coronales de 40 μm , montados en portaobjetos cubiertos con gelatina y revelados en oscuridad en una mezcla 12:6:2 de goma arábica (20%), hidroquinona (5.6%), buffer de citratos y 1 ml de una solución al 17% de nitrato de plata.

6.2.3. Análisis histológicos

Los cortes procesados con la técnica histoquímica de Timm fueron examinados por microscopía de luz con el propósito de evaluar la presencia y distribución de los gránulos de Timm, que a su vez revelan la distribución de los botones sinápticos (Rekart et al., 2007). Así, el uso de la técnica histoquímica de Timm revela la alta concentración de zinc en los botones gigantes de las fibras musgosas (Frederickson et al., 1983), evidenciando la organización laminar de la arquicorteza. Esta evidencia ha sido corroborada recientemente por imágenes de resonancia magnética, las cuales muestran incrementos en el área CA3 del hipocampo, generados por el entrenamiento en el laberinto acuático de Morris, correlacionados con incrementos en la región estrato oriens/estrato piramidal observados con la técnica histoquímica de Timm (Zhang et al., 2016).

Para el análisis histológico, se eligió un corte de cada seis secciones por animal (AP -3.2 a 3.5) a partir del polo septal del hipocampo dorsal. El área CA3 de estas secciones coronales fue captada por una cámara digital (Coolpix 5000, Nikon, Tokio,

Japón) conectada al microscopio óptico (Eclipse E600, Nikon, Tokio, Japón). Estas imágenes fueron ecualizadas con los mismos parámetros de brillo y contraste (Adobe Photoshop CS). Las imágenes digitales fueron analizadas con un programa de análisis de imágenes (Scion Image, Scion Co., Frederick MD) como ha sido analizado con anterioridad (Ramírez-Amaya et al., 2001). Brevemente en cada imagen se midió el área de gránulos de Timm con un área de densidad óptica de entre los 120-255 puntos en escala de grises (32 bits).

Estos resultados fueron corroborados a través de la utilización de una metodología alternativa previamente reportada (Rekart et al., 2007; Gómez Palacio-Schjetnan y Escobar, 2008; Gómez-Palacio Schjetnan y Escobar, 2012; Ramos-Languren et al., 2013; Juárez-Muñoz et al., 2017). Para ello se realizaron medidas del área de interés a través de una rejilla de conteo (cuadros= 25 μm por lado) que fue digitalmente superpuesta en las imágenes. Posteriormente se encontraron las intersecciones de la rejilla pertenecientes al SL o SOSP que contaban con un oscuro precipitado por Timm. Cuando se adquirieron las medidas por ambas metodologías (obtenidas mediante Scion Image y con la rejilla reportada por Rekart y cols. 2007) se hicieron comparaciones entre grupos utilizando la proporción del área estimada de SOSP entre el área SL para tomar en consideración cualquier diferencia en el tamaño de los hipocampos entre animales.

6.2.4. Diseño experimental. Fase 2

Con la finalidad de analizar los efectos de la inhibición de la transcripción sobre el incremento de la eficiencia sináptica y la reorganización morfológica, producidas por la administración aguda de BDNF en la vía de las fibras musgosas hipocampales, los grupos experimentales fueron divididos de la siguiente manera:

- Grupo (BDNF): que fue sometido al registro electrofisiológico antes descrito. Este grupo recibió una microinfusión aguda de BDNF (2 µg/ 2 µl; 0.2 µl/min; Alomone Labs., Jerusalem; (Gómez-Palacio-Schjetnan y Escobar, 2008; Schjetnan y Escobar, 2012) preparado en buffer de fosfatos (PBS) como vehículo, en el área CA3 hipocampal, inmediatamente después del registro de la línea base (20 min). Una vez infundida la neurotrofina, el registro electrofisiológico continuó por 4 horas.
- Grupo (PBS): que fue procesado de forma similar al grupo BDNF recibiendo en este caso una infusión de PBS (utilizado como vehículo de BDNF; 2 µl; 0.2 µl/min) después de la obtención de la línea base. Una vez infundido el vehículo, el registro electrofisiológico continuó por 4 horas.
- Grupo (DRB+BDNF): que fue sometido al registro electrofisiológico antes descrito. Este grupo recibió una microinfusión aguda de BDNF (2 µg/ 2 µl; 0.2 µl/min; Alomone Labs., Jerusalem; (Gómez-Palacio-Schjetnan y Escobar, 2008; Schjetnan y Escobar, 2012) en presencia de DRB (40 ng/ 0.5 µl; 0.1 µl/min; Sigma-Aldrich; Martínez- Moreno, 2013; Torres-García, 2012; Hagen y Manahan-Vaughan, 2013). Una vez infundido el BDNF, el registro electrofisiológico continuó por 4 horas.

- Grupo (DRB+PBS): el cual recibió una microinfusión aguda de PBS como vehículo de BDNF (2 μ l; 0.2 μ l/min) en presencia de DRB (40 ng/ 0.5 μ l; 0.1 μ l/min; Sigma-Aldrich; Torres-García, 2012; Hagen y Manahan-Vaughan, 2013; Prado-Alcalá et al., 2017). Una vez infundido el PBS, el registro electrofisiológico continuó por 4 horas.

Con la finalidad de analizar los efectos de la inhibición de la traducción de proteínas sobre el incremento de la eficiencia sináptica y la reorganización morfológica, producidas por la administración aguda de BDNF en la vía de las fibras musgosas hipocampales, los grupos experimentales fueron divididos de la siguiente manera:

- Grupo (ANI+BDNF): que fue procesado de forma similar al grupo BDNF recibiendo una microinfusión aguda de BDNF (2 μ g/ 2 μ l; 0.2 μ l/min; Alomone Labs., Jerusalem) en presencia de anisomicina (100 μ g/ 0.5 μ l; 0.5 μ l/sitio; 0.1 μ l/min; TOCRIS, Ellisville, MO; Moguel-González et al., 2008; Rodríguez-Durán et al., 2011). Una vez infundido el BDNF, el registro electrofisiológico continuó por 4 horas.
- Grupo (ANI+PBS): el cual recibió una microinfusión aguda de PBS (2 μ l; 0.2 μ l/min) en presencia de anisomicina (100 μ g/ 0.5 μ l; 0.5 μ l/sitio; 0.1 μ l/min; TOCRIS, Ellisville, MO; Moguel-González et al., 2008; Rodríguez-Durán et al., 2011).. Una vez infundido el vehículo, el registro electrofisiológico continuó por 4 horas.
- Grupo control intacto (CONTROL): el cual fue utilizado para los análisis morfológicos. Los animales de este grupo permanecieron en cajas

individuales por 7 días, después de los cuales fueron perfundidos intracardialmente y sus cerebros analizados histológicamente.

Para los grupos anteriores, al cabo de un período postquirúrgico de 7 días, los cerebros fueron procesados con la técnica histoquímica de Timm con el fin de analizar la estructura sináptica (**Figura 12C**).

Con el propósito de contrastar los efectos observados tras la administración de DRB y ANI sobre la LTP y la reorganización estructural generadas por la administración de BDNF, se procedió a procesar grupos similares a los descritos para la fase 2 empleando las mismas dosis de los inhibidores de síntesis de ARNm y síntesis proteica a fin de analizar sus efectos sobre la LTP generada por alta frecuencia.

7. RESULTADOS

FASE 1

7.1. La administración de BDNF en la neocorteza adulta es capaz de fortalecer un trazo de memoria de aversión al sabor

No se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos durante la línea base de consumo o durante la sesión de adquisición. El promedio de línea base del consumo de agua en ml (\pm E. E. M.) para cada uno de los grupos CASd, CASf, CASd + BDNF, CASd + PBS and CASd + BDNF + K fue: 17.39 ± 0.94 , 19.27 ± 0.77 , 18.83 ± 0.95 , 18.50 ± 0.73 y 17.03 ± 0.88 , respectivamente. Sin embargo, durante la prueba de aversión el ANOVA factorial de dos vías (tomando como factores el tratamiento y la sesiones) reveló diferencias significativas entre los grupos ($F_{4,38} = 4.49$, $p < 0.01$). La prueba post-hoc de Fisher mostró que el grupo CASf presentó una fuerte aversión en comparación con el grupo CASd ($p < 0.01$). De forma interesante, no se observaron diferencias significativas entre los grupos CASf y CASd + BDNF, revelando que la microinfusión de BDNF en la corteza insular es suficiente para transformar un CAS débil en uno fuerte. Sin embargo, el grupo CASd + PBS y el grupo CASd + BDNF + K no difieren con respecto al grupo CASd, mostrando que el incremento en la prueba de aversión producida por BDNF es dependiente de la interacción de esta neurotrofina con su receptor Trk (**Figura 11**).

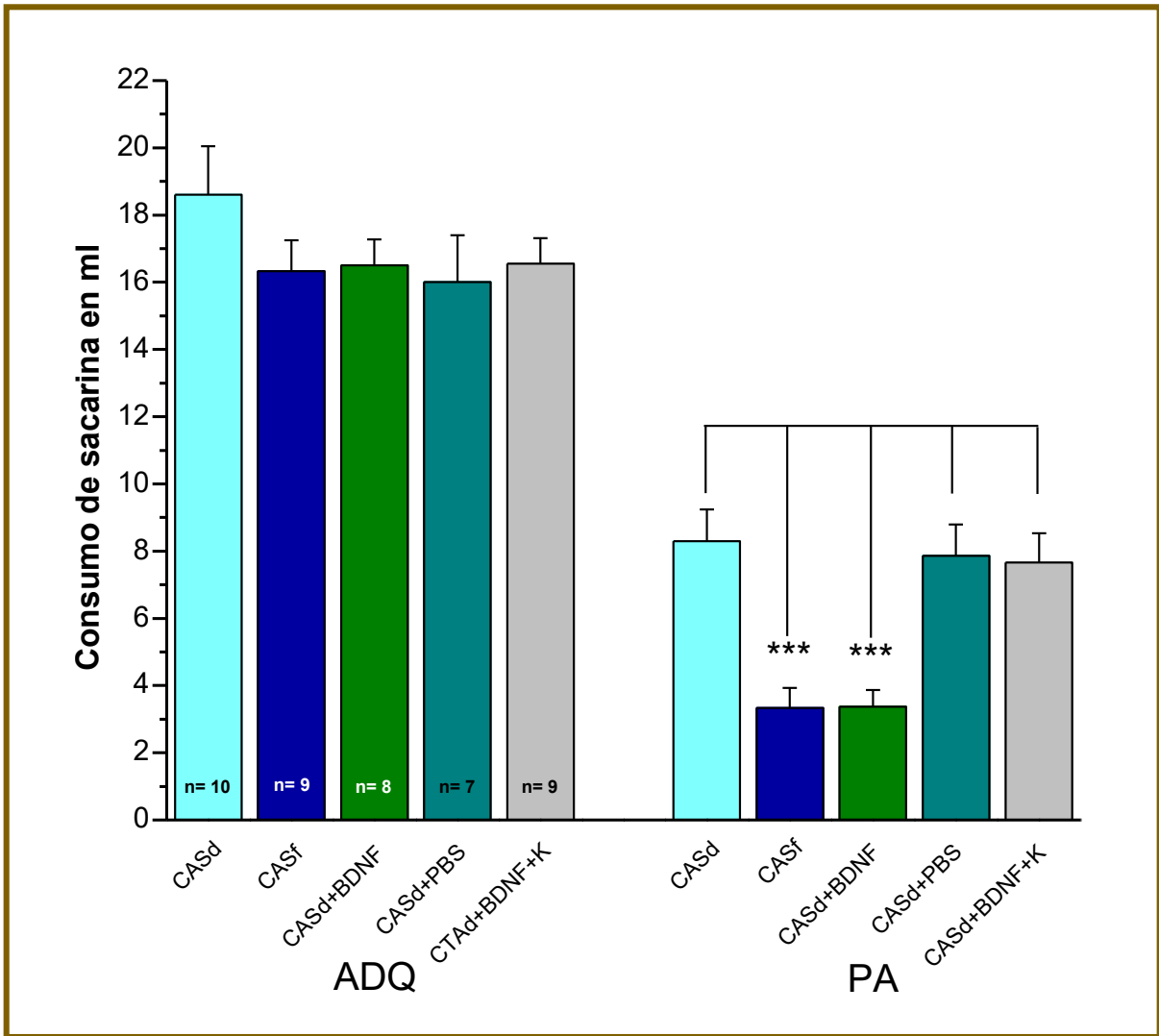


Figura 11. El BDNF transforma un CAS débil en uno fuerte. La microinfusión aguda de BDNF en la corteza insular es capaz de transformar una memoria de aversión débil a una fuerte. Los animales fueron entrenados en una condición de CAS débil (CASd) o CAS fuerte (CASf) y recibieron una microinfusión de BDNF (CASd + BDNF), PBS (CASd + PBS), o una combinación de BDNF y K252a (CASd + BDNF + K). *** $p > 0.001$

FASE 2

Las respuestas características de la señal de las FM inician entre 1.5 a 2.8 ms y presentan su valle hacia los 7 ms. La amplitud promedio de los potenciales durante la línea base fue de 0.42 ± 0.02 mV (media \pm EEM) con una pendiente de 0.16 ± 0.10 (media \pm EEM) (**Figura 12B**). La microinfusión del agonista de los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo II (DCG-IV) (Yoshino et al., 1996; Nicoll y Schmitz, 2005; Matias et al., 2014) deprimió la señal de las FM hasta en un 25% presentando potenciales de 0.10 ± 0.001 (mean \pm EEM) con una pendiente of 0.08 ± 0.001 (media \pm EEM).

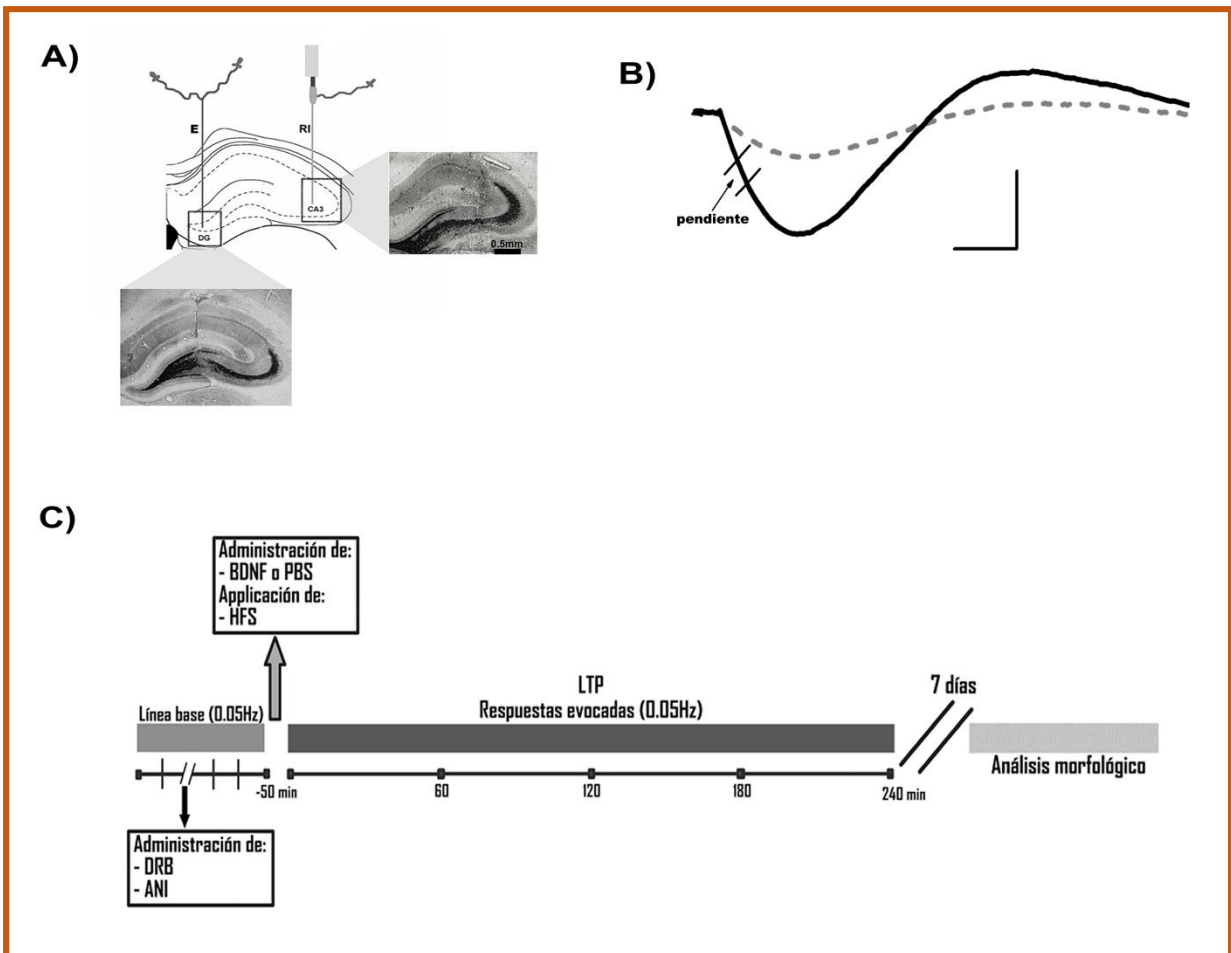


Figura. 12. Procedimiento experimental y localización de electrodos para la fase 2. A) Ubicación del electrodo de estimulación (E) en el giro dentado (GD) y del electrodo de registro-infusión en el área CA3 del hipocampo. B) Trazo representativo de los PPSEs obtenidos en la línea base (línea negra sólida) y después de la aplicación de DCG-IV (línea punteada). Nótese que la aplicación de DCG-IV bloquea las respuestas de las FM a un 25% de la señal de la línea base. C) Esquema del procedimiento experimental para la fase 2. Escala de la barra 5 ms y 0.25 mV.

7.2. El BDNF induce LTP en la vía de las FM a pesar de la inhibición de los procesos de transcripción génica y traducción de proteínas

Los resultados del presente estudio muestran que la infusión aguda de BDNF (2 μ g/2 μ l) incrementa la eficiencia de la comunicación sináptica entre el GD y el área CA3 del hipocampo, en concordancia con investigaciones previas (Gómez-Palacio Schjetnan y Escobar, 2008; Gómez-Palacio Schjetnan y Escobar, 2012). Por su parte, la administración de PBS (vehículo de BDNF) no produjo modificaciones en la transmisión sináptica basal. Con base en estos resultados analizamos el efecto de la inhibición tanto de la transcripción génica como de la traducción de proteínas en la LTP inducida por administración de BDNF. Los resultados revelaron que la infusión aguda de esta neurotrofina en el área CA3 del hipocampo es suficiente para inducir LTP aún en presencia de inhibidores ya sea de la síntesis de ARNm o de la síntesis de nuevas proteínas (**Figura 13**). El ANOVA reveló diferencias significativas entre los grupos ($F_{5, 30} = 38.63, p < 0.001$). El análisis post-hoc de Fisher mostró diferencias significativas entre los grupos BDNF, DRB+BDNF y ANI+BDNF, respecto a los grupos control: PBS, DRB+PBS y ANI+PBS ($p < 0.001$). Los porcentajes de cambio (\pm E.E.M.) en la pendiente de los PPSEs para los grupos BDNF, PBS, DRB+BDNF,

DRB+PBS, ANI+BDNF y ANI+PBS hacia los últimos 20 min de registro electrofisiológico fueron 164.46 ± 0.35 , 101.6 ± 0.45 , 154.18 ± 0.27 , 102.23 ± 0.5 , 141.03 ± 0.21 , y 99.22 ± 0.37 , respectivamente.

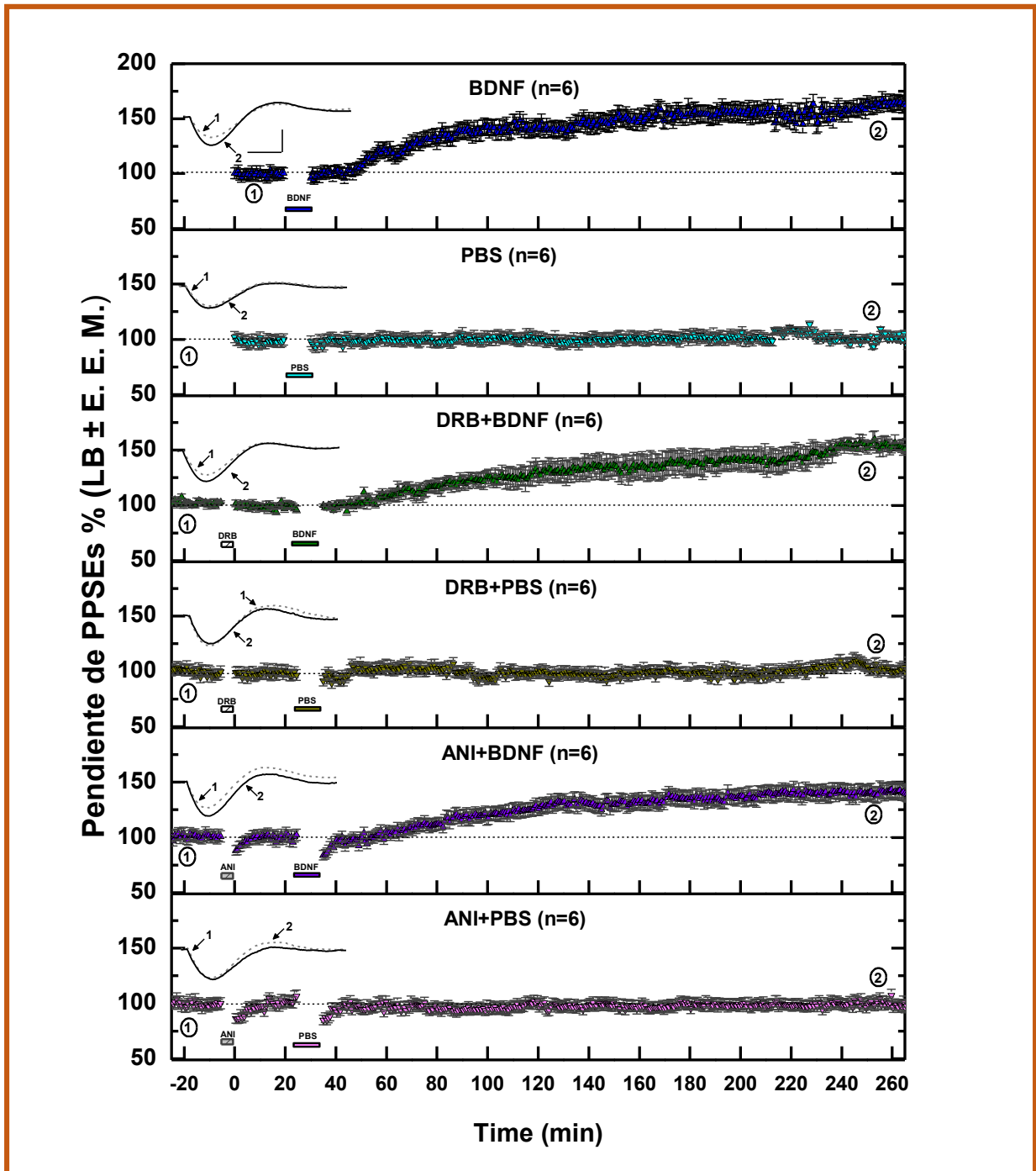


Figura 13. La administración de BDNF induce LTP en la vía de las FM a pesar de la inhibición de los procesos de transcripción y traducción de proteínas. La figura muestra el cambio en el porcentaje de la pendiente de los potenciales post sinápticos excitatorios (PPSEs) con respecto a la línea base (LB). Las barras indican el momento de la infusión de ANI o DRB (5 min) y de la infusión de BDNF o PBS (10 min). En la parte superior de las gráficas para cada grupo se muestran trazos representativos de señales obtenidas durante la línea base (1, línea punteada) y al final del registro electrofisiológico (2, línea sólida). Escala de la barra en la señal 0.5 ms y 0.5 mV.

7.3. El BDNF genera una reorganización estructural en el área CA3 de manera independiente de la síntesis de ARNm y de proteínas *de novo*

La plasticidad funcional es acompañada de una reorganización estructural de las fibras musgosas en la región del estrato oriens-piramidal (SOSP) del área CA3 del hipocampo, que prevalece aún en presencia de los inhibidores DRB y ANI (**Figura 14A, g-h, k-l**). Los grupos control intacto y PBS muestran botones musgosos casi exclusivamente en la región del SL del área CA3 (Figura 14A a-b, e-f) en concordancia con hallazgos previos (Escobar, et al., 1997; Ramírez-Amaya et al., 2001; Rekart, et al., 2007). El ANOVA del análisis densitométrico reveló diferencias significativas entre los grupos ($F_{6, 35} = 41.9, p < 0.001$). Por su parte, el análisis post-hoc de Fisher mostró que los grupos BDNF, DRB+BDNF y ANI+BDNF presentaron un mayor grado de sinaptogénesis en la región ipsilateral del SOSP en comparación con los grupos CONTROL, PBS, DRB+PBS y ANI+PBS ($p < 0.001$) (**Figura 14B**). Estos resultados indican que la administración aguda de BDNF es suficiente para producir plasticidad funcional y reorganización estructural en las FM a pesar de la inhibición de los procesos de transcripción génica y traducción de proteínas.

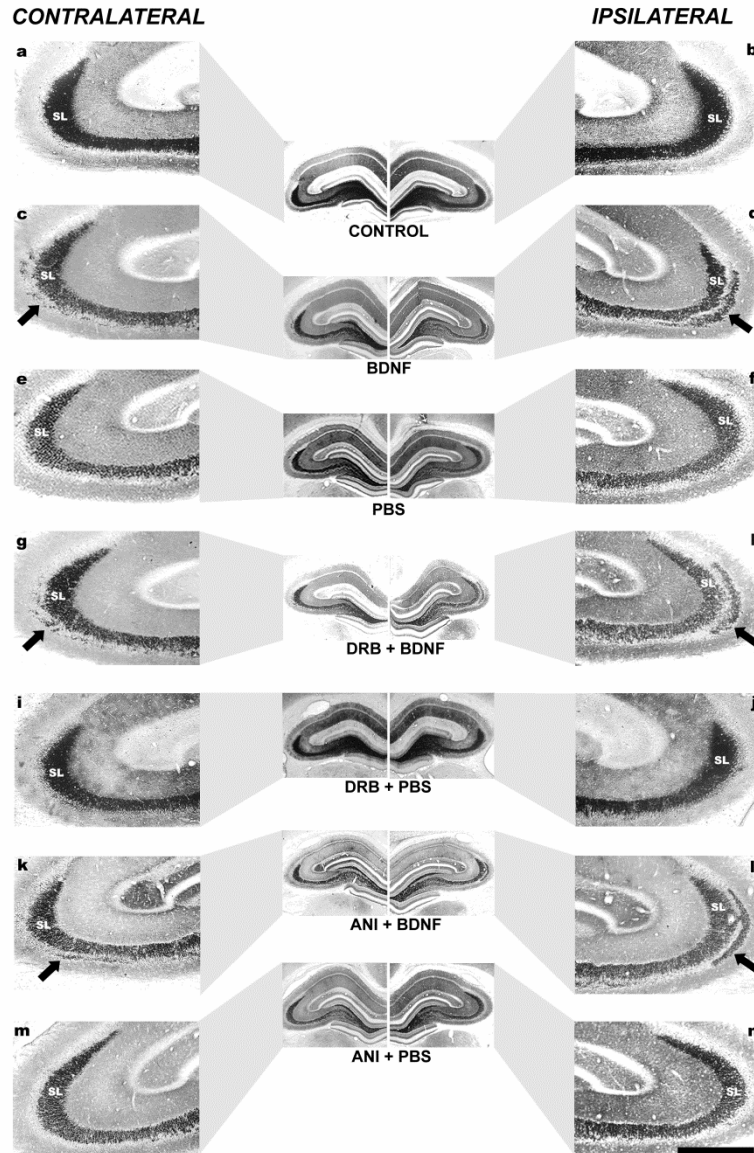
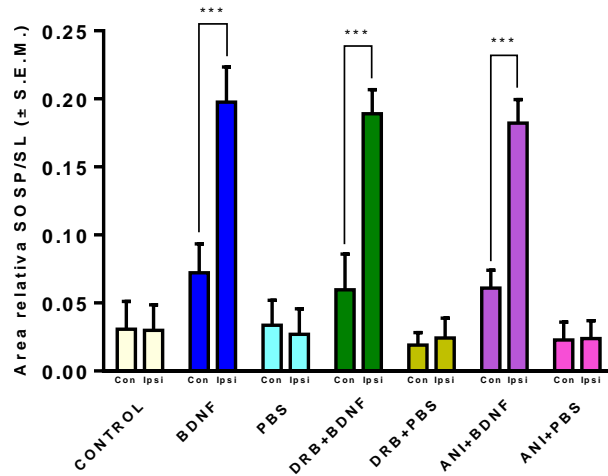
A)**B)**

Figura 14. La administración de BDNF induce reorganización sináptica en las FM a pesar de la inhibición de los procesos de transcripción y traducción proteínica.

A) Secciones coronales (40 μm) de los hipocampos dorsales observadas al microscopio (4x y 10x) procesados por la técnica histoquímica de Timm provenientes de los grupos: control intacto (a y b), BDNF (c y d), PBS (e y f), DRB+BDNF (g y h), DRB+BDNF (i e j), ANI+BDNF (k y l), y ANI+PBS (m y n); mostrando la distribución de las fibras musgosas teñidas con Timm en el estrato lucido (SL) y en el estrato oriens/piramidal (SOSP) (flecha). **B)** Análisis densitométrico de la reorganización morfológica de las fibras musgosas hipocampales. La gráfica muestra el área relativa (SOSP/SL) del área teñida con Timm en el área CA3 del hipocampo dorsal contralateral (con) e ipsilateral (ipsi) de los respectivos grupos, obtenidas a través de las densitometrías analizadas con el programa de análisis de imágenes Scion Image, Scion Co., Frederick MD. Escala de la barra: 1mm *** $p < 0.0001$.

7.4. En contraste, tanto la LTP como la reorganización estructural de las FM hipocampales inducidas por HFS requieren de síntesis de ARNm y de proteínas de novo

Los resultados derivados del análisis de los grupos en los que se indujo LTP por aplicación de HFS en presencia de los inhibidores DRB o ANI muestran que, bajo condiciones de inhibición de síntesis de ARNm, la aplicación de HFS induce, pero no mantiene la LTP, en tanto que la inhibición de síntesis de proteínas bloquea la inducción de este fenómeno en concordancia con lo previamente reportado por Barea-Rodríguez et al., 2000; y por Hagena y Manahan-Vaughan, 2013. El ANOVA de medidas repetidas para la pendiente de los PPSEs reveló diferencias significativas entre los grupos 60 min después de la aplicación de HFS ($F_{2, 17} = 32.8$, $p < 0.001$). El análisis post-hoc de Fisher mostró diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los grupos HFS y DRB+HFS, en comparación con el grupo ANI+HFS, 60 min después de la aplicación de HFS. Asimismo, el análisis estadístico hacia los últimos 20 minutos del registro electrofisiológico reveló diferencias significativas ($F_{2, 17} = 45.9$,

p<0.001) entre los grupos. El análisis post-hoc de Fisher mostró que el grupo HFS presentó diferencias significativas respecto al resto de los grupos (p<0.001). Los cambios en el porcentaje de la pendiente de los PPSEs (\pm E.E.M.) para los grupos HFS, DRB+HFS y ANI+HFS en los últimos 20 min de registro fueron 144.66 ± 0.54 , 100.46 ± 0.32 and 103.12 ± 0.23 , respectivamente (**Figura 15**).

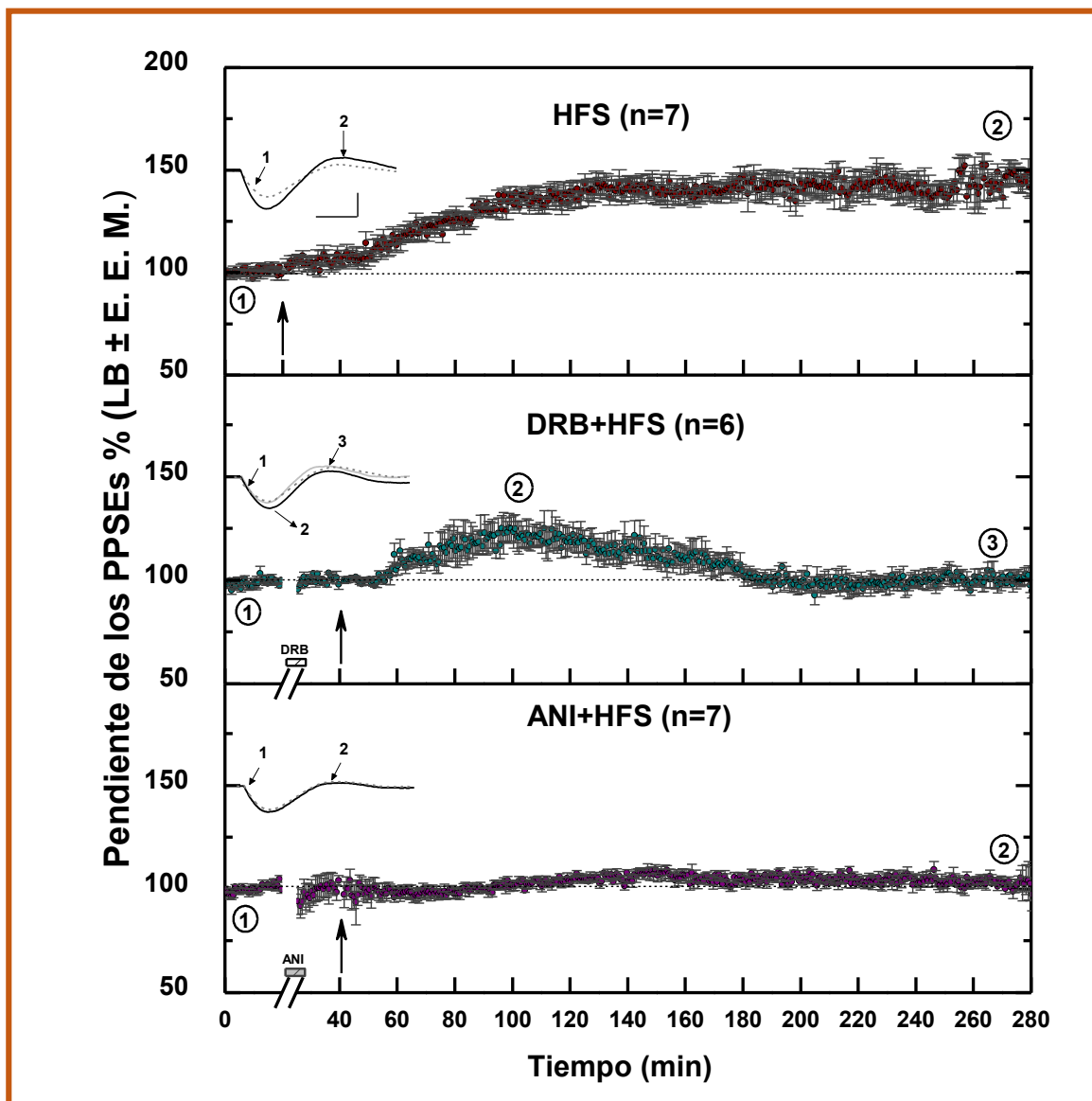


Figura 15. La LTP en la vía de las FM inducida por HFS depende de la síntesis de ARNm y de la síntesis de proteínas de novo. La figura muestra el porcentaje de la pendiente de los potenciales post sinápticos excitatorios (PPSEs) con respecto a la línea base (LB). La flecha indica el momento en el cual se aplicó la estimulación de alta frecuencia (HFS). En la parte superior de la gráfica para cada panel se muestran señales representativas obtenidas durante la línea base (1) y 260 min después de la HFS (2), en el caso del panel medio también se reporta la señal obtenida 60 min después de la aplicación de HFS. B) La gráfica de barras muestra los mismos resultados que el panel A, en este caso mostrando 3 momentos de análisis del registro electrofisiológico: pre (línea base), 60 min post aplicación de HFS y post (260 min después). *** $p < 0.001$, escala de la barra en la señal 0.5 ms y 0.5 mV.

En el presente estudio revelamos por primera vez que la inhibición de la síntesis de ARNm y de proteínas de novo bloquea la reorganización morfológica, generada tras la administración de alta frecuencia (**Figura 16A, e-h**). El ANOVA del análisis densitométrico reveló diferencias significativas entre los grupos ($F_{3, 20} = 16.22$, $p < 0.001$). El análisis post-hoc de Fisher reveló que la región contralateral positiva para Timm es significativamente mayor en el grupo HFS en comparación al resto de los grupos (**Figura 16B**). Estos resultados indican que, al igual que en el caso de la plasticidad funcional, la plasticidad estructural inducida por HFS en la vía de las FM requiere tanto de síntesis de ARNm como de proteínas *de novo*.

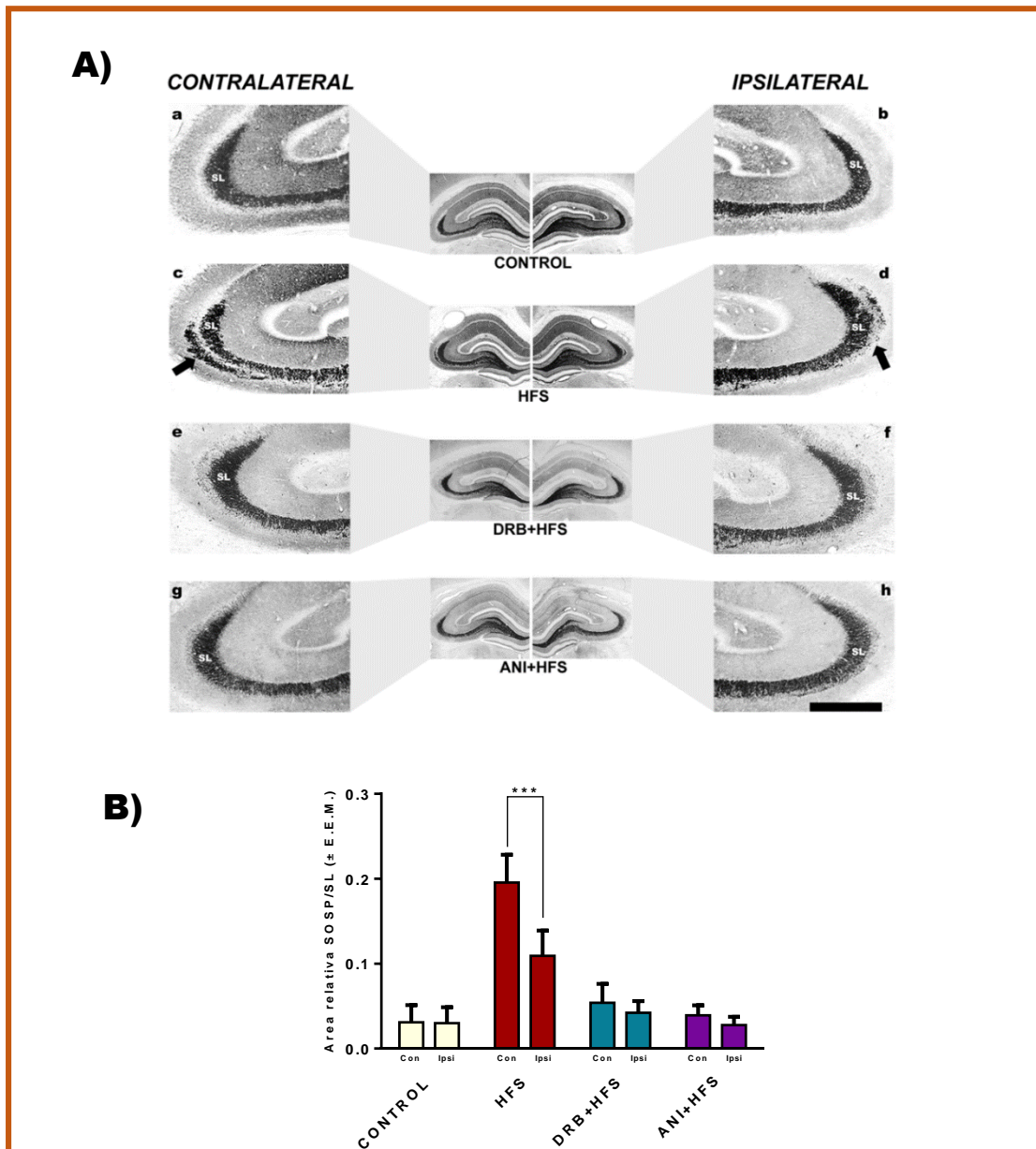


Figura 17. La inhibición de la transcripción y traducción proteínica interfieren con la reorganización sináptica de las fibras musgosas inducida por HFS. A) Secciones coronales (40 μ m) de los hipocampos dorsales observadas al microscopio (4x y 10x) procesadas por la técnica histoquímica de Timm provenientes de los grupos: control intacto (a y b), HFS (c y d), DRB+HFS (e y f), ANI+HFS (g y h); mostrando la distribución de las fibras musgosas teñidas con Timm en el estrato lucido (SL) y en el estrato oriens/piramidal (flecha). **B)** Análisis densitométrico de la reorganización morfológica de las fibras musgosas hipocámpales. La gráfica muestra el área relativa (SOSP/SL) del área teñida con Timm en el área CA3 del hipocampo dorsal contralateral (con) e ipsilateral (ipsi) de los respectivos grupos, obtenidas a través de las densitometrías analizadas con el programa de análisis de imágenes Scion Image, Scion Co., Frederick MD. Escala de la barra: 1mm *** $p < 0.001$.

8. DISCUSIÓN

Hoy en día se considera que el BDNF es una proteína fundamental para la modulación de la plasticidad sináptica dependiente de la actividad en diversas regiones del sistema nervioso central (Drake et al., 1999; Ehrlich y Josselyn, 2015). Se ha observado una alta expresión de esta neurotrofina así como de su receptor de alta afinidad (TrkB) tanto en el hipocampo como en la corteza insular, dos regiones ampliamente implicadas en el almacenamiento de información (Conner et al., 1997; Sakata et al., 2013).

En el presente proyecto que consta de dos fases se analizó en primera instancia la participación del BDNF en el fortalecimiento de la memoria de aversión al sabor en la corteza insular. Mientras que durante la segunda fase se analizó si la LTP producida por BDNF en la vía de las FM hipocampales requiere de la síntesis de ARNm y de nuevas proteínas para el mantenimiento tanto de la eficiencia sináptica como de la reorganización estructural.

8.1. El BDNF regula el proceso de consolidación en la corteza insular fortaleciendo la memoria de aversión al sabor

Recientemente se ha propuesto que el aumento en los niveles de BDNF contribuye al incremento de la memoria (Lee y Silva, 2009; Stern y Alberini, 2013; Kwon et al., 2014). Los resultados derivados del presente estudio revelan que en ratas adultas

que fueron entrenadas bajo una condición de CAS débil (0.1 M) la administración de BDNF en la corteza insular es suficiente para fortalecer la consolidación de esta memoria.

En un estudio llevado a cabo en la amígdala, Rattiner y colaboradores demostraron que el entrenamiento en el condicionamiento de miedo al contexto incrementa los niveles de BDNF y la fosforilación de TrkB (Rattiner et al., 2004). Asimismo, Ma y colaboradores mostraron que la infusión de BDNF en el núcleo central de la amígdala es capaz de incrementar la consolidación de la memoria de aversión al sabor (Ma et al., 2011). Nuestros resultados en este sentido muestran que el efecto producido por el BDNF en la neocorteza es importante para la formación de la memoria de aversión al sabor y sugieren que la magnitud del CAS está asociada a los niveles de BDNF en la CI.

La misma concentración de BDNF utilizada en el presente trabajo es capaz de producir un incremento en la transmisión sináptica *in vivo* en la vía de proyección que va del núcleo basolateral amigdalino a la corteza insular (Bla-CI) (Escobar et al., 2003) y de revertir el déficit en la memoria del CAS provocado por la inhibición de síntesis de proteínas (Moguel-González, et al., 2008). Estas evidencias apoyan la noción de que el BDNF es un elemento clave de la señalización sináptica que subyace a los procesos de aprendizaje y memoria, y que un incremento en esta neurotrofina correlaciona con un incremento de la memoria. En este mismo orden de ideas, un número importante de estudios ha revelado que los potenciadores de los procesos cognitivos, sustancias que facilitan la inducción o incrementan la estabilidad

de la plasticidad sináptica, activan al complejo BDNF-TrkB (Kwon et al., 2014; Ip et al., 2015; Singewald et al., 2015).

Los mecanismos a través de los cuales el BDNF ejerce sus efectos potenciadores sobre la memoria del CAS se vinculan a las acciones de esta neurotrofina sobre los componentes pre y postsinápticos involucrados. En la presinapsis se ha observado que la presencia de BDNF incrementa la exocitosis glutamatérgica, a través de la modulación de los mecanismos de liberación presinápticos (Pozzo-Miller, et al., 1999; citado por Cheng, Song y Augustine, 2017). Mientras que, en la postsinapsis, la señalización del complejo BDNF-TrkB induce la fosforilación de los receptores NMDA, que incrementa la probabilidad de su apertura y en consecuencia promueve un aumento del flujo de calcio (Caldeira, et al., 2007a). Este último evento activa a las proteínas cinasas PKC y CaMKII, promoviendo la fosforilación e inserción membranal de los receptores AMPA, aumentando de esta manera la excitabilidad neuronal (Messaoudi et al., 2002; Caldeira et al., 2007b; Fortin et al., 2012; Leal et al., 2017). Los resultados de la presente investigación muestran que el fortalecimiento de la memoria del CAS producida por BDNF es dependiente de la activación de los receptores Trk. Al respecto, estudios previos de nuestro grupo de investigación en la CI han evidenciado que las cascadas de señalización desencadenadas por la activación del receptor Trk contribuyen a las funciones asociadas a la memoria que se lleva a cabo en la CI (Castillo et al., 2006; 2011). Particularmente, se ha mostrado que la microinfusión de BDNF previa al entrenamiento en el CAS modifica la extinción de esta tarea (Castillo et al., 2006) de forma dependiente tanto de la vía de las MAPK como de la PI3K (Castillo et al., 2011). La activación de las cascadas de

señalización activadas por la interacción BDNF-TrkB conduce a la síntesis de nuevas proteínas a través de la activación de factores de iniciación como el factor de iniciación de la traducción eucarionte 4 (eIF4E), así como de factores de transcripción como CREB, promoviendo así la expresión de genes de expresión temprana (Musumeci y Minichiello, 2011; Kuipers et al., 2016), así como la formación de nuevos contactos sinápticos (Verpelli et al., 2010). Esta serie de modificaciones en la comunicación y estructura sinápticas promovidas por BDNF, favorecen las condiciones para incrementar la eficiencia en la comunicación sináptica.

Los presentes resultados demuestran que la administración de BDNF en la CI adulta a una concentración capaz de inducir un incremento en la eficiencia sináptica en la vía de proyección Bla-CI, es suficiente para incrementar un trazo de memoria de aversión al sabor.

8.2. El BDNF es capaz de incrementar la eficiencia sináptica y la sinaptogénesis en la vía de las FM, de manera independiente tanto de la transcripción génica como de la traducción de proteínas

El BDNF juega un papel sustancial en la modulación de la plasticidad sináptica en el hipocampo. Esta aseveración ha sido evidenciada tras demostrar que la aplicación exógena de esta neurotrofina induce un incremento y una facilitación de la transmisión sináptica en distintas regiones hipocampales (Kang y Schuman, 1995;

Messaoudi et al., 2002; Gómez-Palacio Schjetnan y Escobar, 2008; Schjetnan y Escobar, 2012; Graves et al., 2016) y que el decremento en la señalización de BDNF a través del bloqueo o la desactivación genética de los receptores TrkB impide la inducción de LTP (Lu et al., 2008; Guo et al., 2018). Entre las diferentes regiones del hipocampo, las fibras musgosas constituyen un modelo importante para el estudio de la plasticidad sináptica debido a que experimentan de forma paralela modificaciones funcionales y morfológicas dependientes de la actividad (Ramírez-Amaya et al., 2001; Rekart et al., 2007).

Investigaciones previas de nuestro grupo de investigación revelaron que la administración aguda de BDNF en el área CA3 del hipocampo es capaz de producir un incremento prolongado en la eficiencia sináptica en la vía de las FM (Gómez-Palacio Schjetnan y Escobar, 2008; Schjetnan y Escobar, 2012). En el presente estudio reproducimos este fenómeno, observando que el incremento de la plasticidad funcional comienza hacia los 20 min tras la administración de la neurotrofina, se estabiliza una hora más tarde, y se mantiene hasta por 4 horas después de la infusión de la neurotrofina. La cinética de este fenómeno está asociada al hecho de que la LTP inducida por BDNF no requiere de la activación de los receptores NMDA (Messaoudi et al., 2002; Thompson et al., 2003) pero sí de una alta contribución de los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) y de los receptores TrkB que se sabe tienen una cinética de activación más lenta en comparación a la de los receptores NMDA (Park y Poo, 2013; Ehrlich y Josselyn, 2015; Hashimoto et al., 2017).

El análisis del papel que juegan la transcripción y traducción génicas asociadas a las expresiones de plasticidad nos acerca a entender los mecanismos de comunicación celular que subyacen a la persistencia de la información. En el presente trabajo demostramos que la LTP producida por la infusión aguda de BDNF es independiente de la síntesis de ARNm y de la traducción de proteínas *de novo*.

En apoyo a estos hallazgos, estudios previos han demostrado que el BDNF es una proteína que por sí misma es capaz de inducir y mantener las modificaciones funcionales dependientes de la actividad (Gómez-Palacio Schjetnan y Escobar, 2008; Moguel-González et al., 2008; Martínez-Moreno et al., 2011), y que aún bajo el efecto de la inhibición de síntesis de proteínas, la administración de esta neurotrofina es capaz de rescatar la fase tardía de la LTP en la vía del patrón perforante (Pang et al., 2004). Asimismo, se ha demostrado que la LTP inducida por BDNF en la vía de las colaterales de Shaffer al área CA1 del hipocampo puede ser generada de manera independiente de las proteínas y del ARNm sintetizados en el soma neuronal (Kang y Schuman, 1996).

Los presentes hallazgos pueden ser interpretados a la luz de la hipótesis del “marcaje y captura sináptica”, según la cual una fuerte estimulación provoca la síntesis de proteínas y ARNm en el soma, denominados genéricamente “productos relacionados a la plasticidad” (PRPs) que son transportados a las dendritas. Estos PRPs sólo pueden ser capturados por marcas sinápticas previamente generadas por estimulación tetánica, permitiendo únicamente la modificación de las sinapsis activas (Frey y Morris, 1997; Reymann y Frey, 2007; citados por Lu, et al., 2008; Viola et al., 2014). La producción de los PRPs en la neurona postsináptica es necesaria para el

fortalecimiento sináptico y estos PRPs son compartidos por las sinapsis marcadas (Rogerson et al., 2014). En este sentido, una vasta evidencia experimental sugiere que el BDNF es considerado un PRP y que el receptor TrkB actúa como “la marca sináptica” (Pang et al., 2004; Barco et al., 2005; Lu, et al., 2008; Sharma et al., 2017; Dasgupta et al., 2018).

En este sentido, se sabe que la unión del BDNF con el receptor TrkB produce la dimerización y autofosforilación de este último en los residuos de tirosina de su dominio intracelular, generando la subsecuente activación de vías de señalización tales como las de las MAPK, PLC γ y PI3-K. La activación de estas cascadas de transducción de señales converge en la activación de factores de transcripción tales como CREB, que induce la transcripción de genes de expresión temprana como Arc y Zif268, generando cambios sinápticos de larga duración (Ehrlich y Josselyn, 2015). Aunado a lo anterior, se ha reportado que entre las proteínas activadas por la señalización desencadenada por la acción del BDNF, se encuentra la proteína adenilato ciclasa cuya activación repercute a su vez en la activación de la cinasa PKA. El BDNF influye asimismo en la fosforilación de los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR), ambas proteínas esenciales para la generación de incrementos de la eficiencia sináptica en las FM (Henz, Urban y Barrionuevo, 2000; Wang et al., 2003; Evstratova y Tóth, 2014).

Los cambios morfológicos que suelen acompañar a las modificaciones funcionales son considerados un correlato físico de la plasticidad sináptica (Caroni, et al., 2012). Diversas proteínas están implicadas en la reorganización estructural asociada a la plasticidad sináptica. Entre éstas, el BDNF ha emergido como una

proteína clave para la inducción y el mantenimiento de las modificaciones morfológicas dependientes de la actividad en el cerebro adulto (Bramham, 2007; Kellner et al., 2014). Los resultados derivados del presente estudio muestran que la administración de BDNF provoca una reorganización morfológica en el área CA3 del hipocampo, en concordancia con investigaciones previas de nuestro laboratorio (Gómez-Palacio Schjetnan y Escobar, 2008; Schjetnan y Escobar, 2012). De manera notable, en el presente estudio revelamos que dicha sinaptogénesis no se ve afectada por la inhibición de la síntesis de ARNm y de proteínas *de novo*.

En este sentido, se ha observado que la administración de BDNF puede incrementar el número de espinas dendríticas y de producir una reorganización sináptica en el hipocampo a través de la polimerización de actina en las espinas dendríticas (Rex et al., 2007; Cunha et al., 2010; Zagrebelsky et al., 2018). Dentro de las vías que intervienen en los cambios estructurales provocados por BDNF se encuentran la vía TrkB-Ras-MAPK y la vía PI3K-AKT-mTOR (Alonso et al., 2004; Kumar et al., 2005; citados por Park y Poo, 2013). Por otra parte, en un estudio conducido por Liao y colaboradores, se observó que la administración de BDNF incrementa la expresión de proteínas relacionadas a la plasticidad estructural, tanto en los somas neuronales como en las dendritas, en cultivos celulares de neuronas corticales (Liao et al., 2007). Esta serie de evidencias sustenta la idea de que el BDNF es capaz de prescindir de la síntesis de ARNm y de la transcripción de proteínas para producir modificaciones tanto funcionales como estructurales en la vía de las FM hipocampales.

8.3. La LTP y la reorganización estructural en las FM hipocampales inducidas por HFS requieren de síntesis de ARNm y de proteínas *de novo*

Los resultados del presente estudio muestran que, en contraste con la LTP generada tras la infusión de BDNF, la inducida por estimulación de alta frecuencia requiere de la síntesis de ARNm y de proteínas *de novo* en concordancia con investigaciones previas (Hagena y Manahan-Vaughan, 2013).

Asimismo, nuestros hallazgos revelan por primera vez que la inhibición de la síntesis de ARNm y de proteínas *de novo* bloquea la reorganización morfológica, generada tras la administración de alta frecuencia. En este sentido, se sabe que las modificaciones de la estructura sináptica involucran incrementos en la síntesis de proteínas, modificaciones de las proteínas del citoesqueleto, así como aumentos en el número de proteínas de adhesión celular (Washbourne et al., 2004; Hotulainen y Hoogenraad 2010; Kasai et al., 2010). Teniendo en consideración lo anterior, es predecible que algún evento que comprometa la síntesis de ARNm y de proteínas *de novo*, como la administración de los inhibidores empleados en el presente estudio, afecten directamente las modificaciones estructurales generadas tras la LTP inducida por HFS.

En resumen, la serie de hallazgos del presente estudio en conjunto indican que el BDNF es un modulador esencial de la fortaleza y el mantenimiento de la plasticidad sináptica neo y paleocortical capaz de incrementar el trazo de una memoria aversiva dependiente de la integridad de la corteza insular, así como de

inducir y mantener la plasticidad sináptica funcional y estructural de las fibras musgosas hipocampales.

9. CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio muestran que:

- La infusión de BDNF en la CI transforma un CAS débil en uno fuerte.
- El fortalecimiento de la memoria de aversión al sabor generada por BDNF es dependiente de la activación de los receptores Trk.
- La administración de BDNF en la neocorteza adulta es suficiente para incrementar un trazo de memoria aversiva.
- La infusión de BDNF es suficiente para provocar un incremento en la eficiencia sináptica de larga duración en la vía de las FM, así como una reorganización estructural en el área CA3 del hipocampo, de manera independiente de la síntesis de ARNm y de la traducción de proteínas.
- La inducción y el mantenimiento de la LTP, así como la sinaptogénesis en la vía de las FM asociadas a la aplicación de alta frecuencia se ven interferidas por la inhibición de los procesos de transcripción génica y de traducción de proteínas.

10. REFERENCIAS

1. Aarse, J., Herlitze, S., y Manahan-Vaughan, D. (2016). The Requirement of BDNF for Hippocampal Synaptic Plasticity Is Experience-Dependent. *Hippocampus*, 26(6), 739 – 751.
2. Acsády, L., Kamondi, A., Sik, A., Freund, T., y Buzsáki, G. (1998). GABAergic cells are the major post synaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. *J Neurosci*, 18, 3386–3403.
3. Alonso, M., Vianna, M. R. M., Depino, A. M., Mello e Souza, T., Pereira, P., Szapiro, G., Viola, H., Pitossi, F., Izquierdo, I., y Medina, J. H. (2002). BDNF-triggered events in the rat hippocampus are required for both short- and long-term memory formation. *Hippocampus*, 12, 551–560.
4. Alvarez, P., y Squire, L. R. (1994). Memory consolidation and the medial temporal lobe: A simple network model. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, 7041-7045.
5. Amaral, D. G. (1979). Synaptic extensions from the mossy fibers of the fascia dentata. *Anat Embryol (Berl)*. 155(3), 241-51
6. Andersen, P. (2007). *The hippocampus book* Oxford; New York: Oxford University Press.
7. Atkins, C. M, Selcher, J. C., Petraitis, J. J., Trzaskos, J. M., y Sweatt, J. D. (1998). The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nat Neurosci*, 1(7), 602-609.
8. Barco, A., Patterson, S. L., Alarcon, J. M., Gromova, P., Mata-Roig, M., Morozov, A., y Kandel, E. R. (2005). Gene expression profiling of facilitated L-LTP in VP16-CREB mice reveals that BDNF is critical for the maintenance of LTP and its synaptic capture. *Neuron*. 48(1), 123-37
9. Barea-Rodríguez, E. J., Rivera, D. T., Jaffe, D. B., y Martínez, J. L., Jr. (2000). Protein synthesis inhibition blocks the induction of mossy fiber long-term potentiation in vivo. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*, 20, 8528–8532.

10. Bartsch, T., y Wulff, P. (2015). The hippocampus in aging and disease: from plasticity to vulnerability. *Neurosci*, 309: 1-16.
11. Bear, M. F., Connor, B. W., y Paradiso, M. A. (2016). *Neuroscience. Exploring the Brain*. Philadelphia, USA: Wolters Kluwer.
12. Bekinschtein, P., Cammarota, M., Izquierdo, L. M., Bevilaqua, L. R. M., Izquierdo, I., y Medina, J. H. (2007). Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. *Neuron*, 53, 261–277.
13. Bermúdez-Rattoni, F. (2004). Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nat Rev Neurosci*, 5 (3), 209-217.
14. Bermúdez-Rattoni, F., Ramírez-Lugo, L., Gutiérrez, R., y Miranda, M. I. (2004). Molecular signals into the insular cortex and amygdala during aversive gustatory memory formation. *Cell Mol Neurobiol*, 24 (1), 25-36.
15. Bermúdez-Rattoni, F. (2014). The forgotten insular cortex: Its role in recognition memory formation. *Neurobiol Learn Mem*, 109, 207-216.
16. Bliss, T.V., y Collingridge, G.L., 1993. A synaptic model of memory: longterm potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361, 31–39.
17. Bliss, T. V., y Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*. 232, 331–356.
18. Bliss, T.V., Lancaster, B., y Wheal H.V. (1983). Long-term potentiation in commissural and Schaffer projections to hippocampal CA1 cells: an in vivo study in the rat. *Physiol*, 341, 617–626.
19. Bramham, C. R., Southard, T., Sarvey, J. M, Herkenham, M., y Brady, L. S. (1996). Unilateral LTP triggers bilateral increases in hippocampal neurotrophin and trk receptor mRNA expression in behaving rats: evidence for interhemispheric communication. *J Comp Neurol*, 368, 371–382.

20. Bramham, C. R., y Messaoudi, E. (2005). BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. *Prog Neurobiol*, 76 (2), 99-125.
21. Bramham, C.R. (2007). Control of synaptic consolidation in the dentate gyrus: mechanisms, functions, and therapeutic implications, *Prog. Brain Res.* 163, 453–471.
22. Caldeira, M. V., Melo, C. V., Pereira, D. B., Carvalho, R. F., Carvalho, A. L., y Duarte, C. B. (2007a). BDNF regulates the expression and traffic of NMDA receptors in cultured hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci.* 35(2), 208-19.
23. Caldeira, M. V., Melo, C. V., Pereira, D. B., Carvalho, R., Correia, S. S., Backos, D. S., Carvalho, A. L., Esteban, J. A., y Duarte, C. B. (2007b). Brain-derived neurotrophic factor regulates the expression and synaptic delivery of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor subunits in hippocampal neurons. *J Biol Chem.* 282(17), 12619-28.
24. Calixto, E., Thiels, E., Klann, E., y Barrionuevo, G. (2003). Early maintenance of hippocampal mossy fiber--long-term potentiation depends on protein and RNA synthesis and presynaptic granule cell integrity. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 23, 4842–4849.
25. Caroni, P., Donato, F., y Muller, D. (2012). Structural plasticity upon learning: regulation and functions. *Nat Rev Neurosci.* 13, 478–490..
26. Castillo, D. V., Figueroa-Guzmán, Y., y Escobar, M. L. (2006). Brain-derived neurotrophic factor enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Res*, 1067, 250-255.
27. Castillo, D.V., y Escobar, M.L. (2011). BDNF reverses the CTA memory deficits produced by inhibition of protein synthesis. *Behav. Brain Res.* 217, 248–252.
28. Cheng Q, Song SH, Augustine GJ. (2017). Calcium-Dependent and Synapsin-Dependent Pathways for the Presynaptic Actions of BDNF. *Front Cell Neurosci.*11:75.

29. Clement, J. Q., y Wilkinson, M. F. (2000). Rapid induction of nuclear transcripts and inhibition of intron decay in response to the polymerase II inhibitor DRB. *J Mol Biol* 299, 1179–1191.
30. Conner, J. M, Lauterborn, J. C., Yan, Q., Gall, C. M., y Varon, S. (1997). Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*, 17, 2295–2313.
31. Cunha, C., Brambilla, R., y Thomas, K. L. (2010). A simple role for BDNF in learning and memory? *Front Mol Neurosci*. 3:1.
32. Dasgupta, A., Kim, J., Manakkadan, A., Arumugam, T. V., y Sajikumar, S. (2018). Intermittent fasting promotes prolonged associative interactions during synaptic tagging / capture by altering the metaplastic properties of the CA1 hippocampal neurons. *Neurobiol Learn Mem*.154, 70-77.
33. Davis, H. P., y Squire, L. R. (1984). Protein synthesis and memory: a review. *Psychol Bull*, 96, 518–559.
34. Derrick, B. E., Weinberger, S. B., y Martinez, J. L. Jr. (1991). Opioid receptors are involved in an NMDA receptor-independent mechanism of LTP induction at hippocampal mossy fiber-CA3 synapses. *Brain Res Bull*, 27, 219–223.
35. Domjan, M. (1985). Cue-consequence specificity and long-delay learning revisited. *Ann N Y Acad Sci* 443, 54-66.
36. Drake, C. T., Milner, T. A., y Patterson, S. L. (1999). Ultrastructural localization of full-length trkB immunoreactivity in rat hippocampus suggests multiple roles in modulating activity-dependent synaptic plasticity. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*, 19, 8009–8026.
37. Dudai, Y., y Eisenberg, M. (2004). Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. *Neuron*, 44, 93–100.

38. Dudai, Y., y Morris, R. (2000). To consolidate or not to consolidate: what are the questions? In *Brain, Perception, Memory. Advances in Cognitive Sciences*, J. Bolhuis, ed. Oxford: Oxford University Press, 149-162
39. Ego- Stengel, V., y Wilson, M. A. (2010). Disruption of ripple-associated hippocampal activity during rest impairs spatial learning in the rat. *Hippocampus* 20,1-10.
40. Ehrlich, D. E., y Josselyn, S. A. (2016). Plasticity-related genes in brain development and amygdala-dependent learning. *Genes Brain Behav*, 15(1), 125-43
41. Eichenbaum, H. (1996). Learning from LTP: a comment on recent attempts to identify cellular and molecular mechanisms of memory. *Learn Mem Cold Spring Harb N.* 3, 61–73
42. Escobar, M. L., Alcocer, I., y Bermúdez-Rattoni, F. (2002). In vivo effects of intracortical administration of NMDA and metabotropic glutamate receptors antagonists on neocortical long-term potentiation and conditioned taste aversion. *Behav Brain Res*, 129 (1-2), 101-106.
43. Escobar, M. L., Barea-Rodríguez, E. J., Derrick, B. E., Reyes, J. A., y Martínez, J. L, Jr. (1997). Opioid receptor modulation of mossy fiber synaptogenesis: independence from long-term potentiation. *Brain Res*, 75, 330–335.
44. Escobar, M. L., Alcocer, I., y Chao, V. (1998a). The NMDA receptor antagonist CPP impairs conditioned taste aversion and insular cortex long-term potentiation in vivo. *Brain Res* 812, 246-251.
45. Escobar, M.L., Alcocer, I., y Chao, V. (1998b). The NMDA receptor antagonist CPP impairs conditioned taste aversion and insular cortex long term potentiation in vivo. *Brain Res.* 812, 246-251.

46. Escobar, M. L., Figueroa-Guzmán, Y., y Gómez-Palacio-Schjetnan, A. (2003). In vivo insular cortex LTP induced by brain-derived neurotrophic factor. *Brain Res.* 991, 274–279.
47. Evstratova, A., y Tóth, K. (2014). Information processing and synaptic plasticity at hippocampal mossy fiber terminals. *Front Cell Neurosci.* 8 (28), 1-12.
48. Fernández-Espejo, E. (1996). Basic neurobiology of hippocampal formation. *Rev Neurol*, 24, 779–784.
49. Fortin, D. A., Srivastava, T., Dwarakanath, D., Pierre, P., Nygaard, S., Derkach, V. A., y Soderling, T. R. (2012). Brain-derived neurotrophic factor activation of CaM-kinase kinase via transient receptor potential canonical channels induces the translation and synaptic incorporation of GluA1-containing calcium-permeable AMPA receptors. *J Neurosci.* 32(24), 8127-37.
50. Frederickson, C. J., Klitenick, M. A., Manton, W. I., y Kirkpatrick, J.B. (1983). Cytoarchitectonic distribution of zinc in the hippocampus of man and the rat. *Brain Res.* 273(2), 335-9.
51. Frederickson, C. J., Koh, J-Y., y Bush, A. I. (2005). The neurobiology of zinc in health and disease. *Nat Rev Neurosci*, 6, 449–462.
52. Freeman, K., y Riley, A. (2009). The origins of conditioned taste aversion learning: an historical analysis. In: S. Reilly and T. Schachtman, ed., *Conditioned taste aversion. Behavioral and Neural Process*, 1st ed. New York,: Oxford University Press, pp.9-11.
53. Fukazawa, Y., Saitoh, Y., Ozawa, F., Ohta, Y., Mizuno, K., e Inokuchi, K. (2003). Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the dendritic spine that is essential for late LTP maintenance *in vivo*. *Neuron* 38, 447–460.
54. Galván, E. J., Pérez-Rosello, T., Gómez-Lira, G., Lara, E., Gutiérrez, R., y Barrionuevo, G. (2015). Synapse-specific compartmentalization of signaling cascades for LTP induction in CA3 neurons. *Neurosci*, 290, 332-345.
55. García, J., Kimeldorf, D., y Koelling, R. (1955). Conditioned taste aversion to saccharine resulting from exposure ti gamma radiation. *Science*, 122, 157-158.

56. García, J., y Koelling, R.A. (1966). Relation of cue to consequence in avoidance learning. *Psychonomic Science*, 4, 123-124.
57. García, J., Lasiter, P.S., Bermudez-Rattoni, F., y Deems, D.A. (1985). A general theory of aversion learning. *Ann N Y Acad Sci*, 443, 8-21. .
58. Girardeau, G., Benchenane, K., Wiener, S. I. Buzsá, G., y Zugaro, M. B. (2009). Selective suppression of hippocampal ripples impair spatial memory. *Nat Neurosci*, 12, 1222-1223.
59. Gómez-Palacio-Schjetnan, A., y Escobar, M. L. (2008). In vivo BDNF modulation of adult functional and morphological synaptic plasticity at hippocampal mossy fibers. *Neurosci Lett*, 445, 62–67.
60. Gómez-Palacio-Schjetnan, A., y Escobar, M. L. (2013). Neurotrophins and synaptic plasticity. *Curr Top Behav Neurosci*. 15, 117–136.
61. Graves, A. R., Moore, S. J., Spruston, N., Tryba, A. K., y Kaczorowski C. C. (2016). Brain-derived neurotrophic factor differentially modulates excitability of two classes of hippocampal output neurons. *J Neurophysiol* 116: 466–471.
62. Gruart, A., Sciarretta, C., Valenzuela-Harrington, M., Delgado-García, J. M., y Minichiello, L. (2007). Mutation at the TrkB PLC{gamma}-docking site affects hippocampal LTP and associative learning in conscious mice. *Learn Mem Cold Spring Harb N*, 14, 54–62.
63. Guo, W., Nagappan, G., y Lu, B. (2018). Differential effects of transient and sustained activation of BDNF-TrkB signaling. *Dev Neurobiol*, 78(7):647-659.
64. Hagen, H., y Manahan-Vaughan, D. (2013). Differentiation in the protein synthesis-dependency of persistent synaptic plasticity in mossy fiber and associational/commissural CA3 synapses in vivo. *Front Integr Neurosci*, 7: 10.
65. Harris, E. W., y Cotman, C. W. (1986). Long-term potentiation of guinea pig mossy fiber responses is not blocked by N-methyl D-aspartate antagonists. *Neurosci Lett*, 70, 132–137.

66. Harward, S. C., Hedrick, N. G., Hall, Ch. E., Parra-Bueno P., Milner, T. A., Pan, E., Laviv T., Hempstead B. L., Yasuda R., y McNamara J. O. (2016). Autocrine BDNF–TrkB signalling within a single dendritic spine. *Nature*. 538 (7623), 99-103.
67. Hashimoto-dani, Y., Nasrallah, K., Jensen, K. R., Chávez, A. E., Carrera, D., y Castillo, P. E. (2017). LTP at Hilar Mossy Cell-Dentate Granule Cell Synapses Modulates Dentate Gyrus Output by Increasing Excitation/Inhibition Balance. *Neuron*, 95(4), 928-943.
68. Henze, D. A., Urban, N. N., y Barrionuevo, G. (2000). The multifarious hippocampal fiber pathway: a review, *Neurosci*, 407-427.
69. Hotulainen P, y Hoogenraad CC. (2010). Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *J Cell Biol*. 189, 619–629.
70. Huang, Y. Y., Li, X. C., y Kandel, E. R. (1994). cAMP contributes to mossy fiber LTP by initiating both a covalently mediated early phase and macromolecular synthesis-dependent late phase. *Cell*, 79, 69–79.
71. Huang, Y. Z., Pan, E., Xiong, Z-Q., y McNamara, J. O. (2008). Zinc-mediated transactivation of TrkB potentiates the hippocampal mossy fiber-CA3 pyramid synapse. *Neuron*, 57, 546–558.
72. Igaz, L. M., Vianna, M. R. M., Medina, J. H., e Izquierdo, I. (2002). Two time periods of hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear-motivated learning. *J, Neurosci, Off, J, Soc, Neurosci*, 22, 6781–6789.
73. Ip, F. C. F., Fu, W. Y., Cheng, E. Y. L., Tong, E. P. S., Lok, K. Ch., Liang, Y., Ye, W. C., e Ip, N. Y. (2015). Anemoside A3 enhances cognition through the regulation of synaptic function and neuroprotection. *Neuropsychopharmacology*, 40, 1877-1887.
74. Ji, Y., Lu, Y., Yang, F., Shen, W., Tang, T. T., Feng, L., Duan, S., y Lu, B. (2010). Acute and gradual increases in BDNF concentration elicit distinct signaling and functions in neurons. *Nat Neurosci*, 13(3):302-9.

75. Juárez-Muñoz Y, Rivera-Olvera A, Ramos-Languren LE, y Escobar ML. (2017). CaMKII requirement for the persistence of in vivo hippocampal mossy fiber synaptic plasticity and structural reorganization. *Neurobiol Learn Mem.* 139, 56-62
76. Kandel, E. R, Schwartz, J. H., y Jessell, T. M. (2000). Principles of neural science. New York: McGraw-Hill, Health Professions Division.
77. Kang, H., y Schuman, E. M. (1995). Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus. *Science*, 267, 1658–1662.
78. Kang, H., y Schuman, E. M. (1996). A requirement for local protein synthesis in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity. *Science*, 273, 1402–1406.
79. Kasai, H., Fukuda, M., Watanabe, S., Hayashi-Takagi, A., y Noguchi, J. (2010). Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends Neurosci*, 33, 121–129.
80. Kellner, Y., Godecke, N., Dierkes, T., Thieme, N., Zagrebelsky, M., y Korte, M. (2014) The BDNF effects on dendritic spines of mature hippocampal neurons depend on neuronal activity. *Front Synaptic Neurosci* 6:5
81. Kesner, R. P. (2013). A process analysis of the CA3 sub region of the hippocampus. *Front Cell Neurosci*, 7, 78.
82. Kitamura, T., Ogawa, S. K., Roy, D. S., Okuyama, T., Morrissey, M. D., Smith, L. M., Redondo, R. L., y Tonegawa, S. (2017). Engrams and circuits crucial for systems consolidation of a memory. *Science*, 356 (6333), 73-78.
83. Korte, M., Carroll, P., Wolf, E., Brem, G., Thoenen, H., y Bonhoeffer, T. (1995). Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 8856–8860.

84. Korte, M., Minichiello, L., Klein, R., y Bonhoeffer, T. (2000). Shc-binding site in the TrkB receptor is not required for hippocampal long-term potentiation. *Neuropharmacology*, 39, 717–724.
85. Korte, M., y Schmitz, D. (2016). Cellular and system biology of memory: timing, molecules, and beyond. *Physiol Rev*, 96, 647–693.
86. Kuipers, S. D., Trentani, A., Tiron, A., Mao, X., Kuhl, D., y Bramham, C. R. (2016). BDNF-induced LTP is associated with rapid Arc/Arg3.1-dependent enhancement in adult hippocampal neurogenesis. *Sci Rep*, 6:21222.
87. Kwon, G., Lee, H. E., Lee, D. H., Woo, H., Park, S. J., Gao, Q., Ahn, Y. J., Son, K. H., y Ryu, J. H. (2014). Spicatoside A enhances memory consolidation through the brain-derived neurotrophic factor in mice. *Neurosci Lett*, 572, 58-62.
88. Kwon, H. B., y Catillo, P. E. (2008). Long-term potentiation selectively expressed by NMDA receptors at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron*, 57, 108-120.
89. Leal, G., Comprido, D., y Duarte, C. B. (2014). BDNF-induced local protein synthesis an synaptic plasticity. *Neuropharmacol*, 76, 639–656.
90. Leal, G., Bramham, C.R., y Duarte, C.B. (2017). Chapter Eight – BDNF and Hippocampal Synaptic Plasticity. *Vitamins and Hormones* Volume 104, pp 153–195.
91. Lee, Y-S., y Silva, A. J. (2009). The molecular and cellular biology of enhanced cognition. *Nat Rev Neurosci*, 10, 126–40.
92. Li, Y., Hough, C. J., Frederickson, C. J., y Sarvey, J. M. (2001). Induction of mossy fiber Ca3 long-term potentiation requires translocation of synaptically released Zn²⁺. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*, 21, 8015–8025.
93. Liao, L., Pilotte, J., Xu, T., Wong, C. C. L., Edelman, G. M., Vanderklish, P., y Yates, J. R. (2007). BDNF induces widespread changes in synaptic protein content and up-

regulates components of the translation machinery: an analysis using high-throughput proteomics. *J Proteome Res*, 6, 1059–1071.

94. Lisman, J., Schulman, H., y Cline, H. (2002). The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat Rev Neurosci.*, 3 (3):175-90.
95. Lombroso P., y Ogren M. (2009). Learning and memory, part II: molecular mechanisms of synaptic plasticity. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 48(1), 5-9
96. López-García, J. C, Arancio, O., Kandel, E. R., y Baranes, D. (1996). A presynaptic locus for long-term potentiation of elementary synaptic transmission at mossy fiber synapses in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 4712–4717.
97. Lu, B., Pang, P. T., y Woo, N. H. (2005). The yin and yang of neurotrophin action. *Nat. Rev. Neurosci*, 6, 603–614.
98. Lu, Y., Christian, K., y Lu, B. (2008). BDNF: A key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory? *Neurobiol Learn Mem*, 89, 312-323.
99. Lu, B., Nagappan, G., y Lu, Y. (2014). BDNF and synaptic plasticity, cognitive function, and dysfunction.. *Handb Exp Pharmacol.* ;220:223-50. **Chapter** Neurotrophic Factors Volume 220 of the series Handbook of Experimental Pharmacology pp 223-250.
100. Ma, L., Wang, D. D., Zhang, T. Y., Yu, H., Wang, Y., Huang, S. H., Lee, F. S., Chen, y Z.Y. (2011). Region-specific involvement of BDNF secretion and synthesis in conditioned taste aversion memory formation. *J Neurosci.* 31(6), 2079-90.
101. Madani, R., Hulo, S., Toni, N., Madani, H., Steimer, T., Muller, D., y Vassalli, J. D. (1999). Enhanced hippocampal long-term potentiation and learning by increased neuronal expression of tissue-type plasminogen activator in transgenic mice. *Embo J*, 18, 3007–3012.

102. Maingret, N., Girardeau, G., Todorova, R., Goutierre, M., y Zugaro, M. (2016). Hippocampo-cortical coupling mediates memory consolidation during sleep. *Nat Neurosci.* 19, 959–964.
103. Malenka, R. C., y Bear, M. F. (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron*, 44, 5–21.
104. Manadas, B., Santos, A. R., Szabadfi, K., Gomes, J. R., Garbis, S. D., Fountoulakis, M., y Duarte, C. B. (2009). BDNF-induced changes in the expression of the translation machinery in hippocampal neurons: protein levels and dendritic mRNA. *J Proteome Res*, 8, 4536–4552.
105. Martínez-Moreno, A., Rodríguez-Durán, L. F., y Escobar, M. L. (2011). Late protein synthesis-dependent phases in CTA long-term memory: BDNF requirement. *Front Behav Neurosci*, 22, 1-6.
106. Matias, C. M., Dionisio, J. C., Saggau, P., y Quintana-Ferreira, M. A. (2014). Activation of group II metabotropic glutamate receptors blocks zinc release from hippocampal mossy fibers. *Biol Res*, 47 (1), 73.
107. Mayadevi, M., Archana, G. M., y Omkumar, R. V. (2012). Molecular Mechanisms in Synaptic Plasticity. In *Neuroscience - Dealing With Frontiers*, C.M. Contreras, ed. (InTech).
108. Mayford, M., Siegelbaum, S. A., y Kandel, E. R. (2012). Synapses and memory storage. *Cold Spring Harb Perspect. Biol.* 4.
109. McGaugh, J. L. (2000). Memory-a century of consolidation. *Science*, 287, 248–251.
110. McGowan, B. K., Hankins, W. G., y Garcia, J. (1972). Limbic lesions and control of the internal and external environment. *Behav Biol.* 7(6), 841-52
111. McKernan, M. G., y Shinnick-Gallagher, P. (1997). Fear conditioning induces a lasting potentiation of synaptic currents in vitro. *Nature*, 390, 607–611.

112. Meinkoth, J. L., Alberts, A. S., Went, W., Fantozzi, D., Taylor, S. S., Hagiwara, M., Montminy, M., y Feramisco, J. R. (1993). Signal transduction through the cAMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Bioche.*, 127-128:179-86.
113. Meis, S., Endres, T., Munsch T., y Lessmann, V. (2017). The Relation Between Long-Term Synaptic Plasticity at Glutamatergic Synapses in the Amygdala and Fear Learning in Adult Heterozygous BDNF-Knockout Mice *Cereb Cortex*, 1–14.
114. Messaoudi, E., Ying, S-W, Kanhema, T., Croll, S. D., y Bramham, C. R. (2002). Brain-derived neurotrophic factor triggers transcription-dependent, late phase long-term potentiation in vivo. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*, 22, 7453–7461.
115. Minichiello, L., Calella, A. M., Medina, D. L., Bonhoeffer, T., Klein, R., y Korte, M. (2002). Mechanism of TrkB-mediated hippocampal long-term potentiation. *Neuron*, 36, 121–137.
116. Miranda, M.I., Quirarte, G.L., Rodriguez-Garcia, G., McGaugh, J.L., y Roozendaal, B. (2008). Glucocorticoids enhance taste aversion memory via actions in the insular cortex and basolateral amygdala. *Learn Mem.* 15, 468–476.
117. Miyamoto, Y., Yamauchi, J., Tanoue, A., Wu, C., y Mobley, W. C. (2006). TrkB binds and tyrosine-phosphorylates Tiam1, leading to activation of Rac1 and induction of changes in cellular morphology. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 10444–10449.
118. Moguel-González, M., Gómez-Palacio-Schjetnan, A., y Escobar, M. L. (2008). BDNF reverses the CTA memory deficits produced by inhibition of protein synthesis. *Neurobiol Learn Mem*, 90, 584–587.
119. Moscovitch, M., Nadel, L., Winocur, G., Gilboa, A., y Rosenbaum, R. S. (2006). The cognitive neuroscience of remote episodic, semantic and spatial memory. *Curr Opin Neurobiol*, 16, 179-190.

120. Musumeci G, y Minichiello L. (2011). BDNF-TrkB signalling in fear learning: from genetics to neural networks. *Rev Neurosci*. 22(3), 303-15.
121. Nguyen, P. V., Abel, T., y Kandel, E. R. (1994). Requirement of a critical period of transcription for induction of a late phase of LTP. *Science*, 265, 1104–1107.
122. Nicoll, R. A., y Schmitz, D. (2005). Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses. *Nat Rev Neurosci*, 6, 863–876.
123. Pang, P. T., Teng, H. K., Zaitsev, E., Woo, N. T, Sakata, K., Zhen, S., Teng, K. K, Yung, W-H, Hempstead, B. L., y Lu, B. (2004). Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science*, 306, 487–491.
124. Panja, D., y Bramham, C. R. (2014). BDNF mechanisms in late LTP formation: A synthesis and breakdown. *Neuropharmacology*, 76, 664–676.
125. Park H., y Poo M. (2013). Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat Rev Neurosci*, 14, 7-23.
126. Patterson, S. L., Abel, T., Deuel, T. A., Martin, K. C., Rose, J. C., y Kandel, E. R. (1996). Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron*, 16,1137–1145
127. Patz, S., y Wahle, P. (2004). Neurotrophins induce short-term and long-term changes of cortical neurotrophin expression. *Eur J Neurosci*, 20, 701–708.
128. Paxinos, G., y Watson, C. (2013). The rat brain in stereotaxic coordinates (7a edición). Amsterdam; Boston: Elsevier
129. Poo, M. M. (2001). Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci*, 2 (1), 24-32.
130. Prado-Alcalá, R. A., Medina, A. C., Bello-Medina, P. C., y Quirarte, G. L. (2017). Inhibition of transcription and translation in the striatum after memory reactivation: Lack of evidence of reconsolidation. *Neurobiol Learn Mem*, 142, 21-29.

131. Ramírez-Amaya, V., Balderas, I., Sandoval, J., Escobar, M. L., y Bermúdez-Rattoni, F. (2001). Spatial long-term memory is related to mossy fiber synaptogenesis. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*, 21, 7340–7348.
132. Ramos-Languren, L. E., y Escobar, M. L. (2013). Plasticity and metaplasticity of adult rat hippocampal mossy fibers induced by neurotrophin-3. *Eur J Neurosci*, 37, 1248–1259.
133. Rattiner, L. M., Davis, M., French, C. T., y Ressler, K. J. (2004). Brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor B involvement in amygdala-dependent fear conditioning. *J Neurosci*. 24(20), 4796-806
134. Reilly, S., y Schachtman, T. R. (2009). Conditioned taste aversion. *Behavioral and Neural Process*
135. Rekart, J. L., Holahan, M. R., y Routtenberg, A. (2007). Presynaptic Structural Plasticity and Long-Lasting Memory: Focus on Learning-Induced Redistribution of Hippocampal Mossy Fibers. In *Neural Plasticity and Memory: From Genes to Brain Imaging*, F. Bermúdez-Rattoni, ed. (Boca Raton (FL): CRC Press).
136. Rekkas, P. V., y Constable, R. T. (2005). Evidence that autobiographic memory retrieval does not become independent of the hippocampus: An fMRI study contrasting very recent with remote events. *J Cogn Neurosci*, 17, 1950-1961.
137. Revest, J. M., Le Roux, A., Roullot-Lacarrière, V., Kaouane, N., Vallée, M., Kasanetz, F. F., Rougé-Pont, F., Tronche, F., Desmedt, A., y Piazza, P.V. (2014). BDNF-TrkB signaling through Erk1/2MAPK phosphorylation mediates the enhancement of fear memory induced by glucocorticoids. *Mol Psychiatry*, 19 (9), 1001-1009.
138. Rex, C. S., Lin, C. Y., Kramár, E. A., Chen, L.Y., Gall, C. M., y Lynch, G. (2007). Brain-derived neurotrophic factor promotes long-term potentiation-related cytoskeletal changes in adult hippocampus. *J. Neurosci*. 27, 3017–3029.

139. Rioult-Pedotti, M. S., Friedman, D., Hess, G., y Donoghue, J. P. (1998). Strengthening of horizontal cortical connections following skill learning. *Nat Neurosci*, 1, 230–234.
140. Rodríguez-Durán, L. F., Castillo, D. V., Moguel-González, M., y Escobar, ML. (2011). Conditioned taste aversion modifies persistently the subsequent induction of neocortical long-term potentiation in vivo. *Neurobiol, Learn. Mem*, 95, 519–526.
141. Rodríguez-Serrano, L. M., Ramírez-León, B., Rodríguez-Durán, L. F., y Escobar M. (2014). Acute infusion of brain-derived neurotrophic factor in the insular cortex promotes conditioned taste aversion extinction. *Neurobiol Learn Mem*. 116, 139–44
142. Rogan, M. T., Stäubli, U. V., y LeDoux, J. E. (1997). Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature*, 390, 604–607.
143. Rogerson, T., Cai, D., Frank, A., Sano, Y., Shobe, J., Aranda, M. L., y Silva, A. J. (2014). Synaptic Tagging During Memory Allocation. *Nat Rev Neurosci*, 15(3), 157–169.
144. Rosenblum, K., Meiri, N., y Dudai, Y. (1993). Taste memory: the role of protein synthesis in gustatory cortex. *Behav Neural Biol*, 59, 49–56.
145. Sakata, K., Martinowich, K., Woo, N. W., Schloesser, R. J., Jimenez, D. V., Ji, Y., Shen, L., y Lu, B. (2013). Role of activity-dependent BDNF expression in hippocampal–prefrontal cortical regulation of behavioral perseverance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110(37), 15103–15108.
146. Sano, Y., Shobe, J. L., Zhou, M., Huang, S., Shuman, T., Cai, D. J., Golshani, P., Kamata, M., y Silva, A. J. (2014). CREB regulates memory allocation in the insular cortex. *Curr Biol*. 24(23), 2833–7.

147. Schildt, S., Endres, T., Lessmann, V., y Edelmann, E. (2013). Acute and chronic interference with BDNF/TrkB-signaling impair LTP selectively at mossy fiber synapses in the CA3 region of mouse hippocampus. *Neuropharmacology*, 71, 247–254.
148. Schinder, A. F., y Poo, M. (2000). The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *Trends Neurosci*, 23, 639–645.
149. Schjetnan, A. G-P, y Escobar, M. L. (2012). In vivo BDNF modulation of hippocampal mossy fiber plasticity induced by high frequency stimulation. *Hippocampus*, 22, 1–8.
150. Schratt, G. M., Nigh, E. A., Chen, W. G., Hu, L., y Greenberg, M. E. (2004). BDNF regulates the translation of a select group of mRNAs by a mammalian target of rapamycin-phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway during neuronal development. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*, 24, 7366–7377.
151. Sharma, M., Razali, N. B., y Sajikumar, S. (2017). Inhibition of G9a/GLP Complex Promotes Long-Term Potentiation and Synaptic Tagging/Capture in Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons. *Cereb Cortex*. 27(6), 3161-3171.
152. Shen, W., Wu, B., Zhang, Z., Dou, Y., Rao, Z-R, Chen, Y-R., y Duan, S. (2006). Activity-induced rapid synaptic maturation mediated by presynaptic cdc42 signaling. *Neuron*, 50, 401–414.
153. Singewald, N., Schmuckermair, C., Whittle, N., Holmes, A., y Ressler, K. J. (2015). Pharmacology of cognitive enhancers for exposure-based therapy of fear, anxiety and trauma-related disorders. *Pharmacol Ther*. 149, 150-90.
154. Song, M., Martinowich, K., y Lee F. S. (2017). BDNF at the synapses: why location matters. *Mol Psychiatry*, 22, 1370-1375.
155. Squire, L. R., Genzel, L., Wixted, J. T., y Morris R. G. (2015). Memory consolidation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 7.

156. Squire, L. R., y Kandel, E. R. (1999). *Memory: from mind to molecules* (New York: Scientific American Library : Distributed by W.H. Freeman and Co.
157. Stafford, J. M, y Lattal, K. M. (2011). Is an epigenetic switch the key to persistent extinction? *Neurobiol Learn Mem*, 96, 35–40.
158. Stern, S. A., y Alberini, C. M. (2013). *Mechanisms of Memory Enhancement*. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 5, 37–53.
159. Tanaka, J., Horiike, Y., Matsuzaki, M., Miyazaki, T., Ellis-Davies, G. C., y Kasai, H. (2008). Protein synthesis and neurotrophin-dependent structural plasticity of single dendritic spines. *Science* 319, 1683–1687.
160. Terman, G. W., Drake, C. T., Simmons, M. L., Milner, T. A., y Chavkin, C. (2002). Opioid modulation of recurrent excitation in the hippocampal dentate gyrus. *J Neurosci*, 20(12), 4379-88.
161. Thompson, K. J., Orfila, J. E., Achanta, P., y Martinez, J. L Jr. (2003). Gene expression associated with in vivo induction of early phase-long-term potentiation (LTP) in the hippocampal mossy fiber-Cornus Ammonis (CA)3 pathway. *Cell Mol Biol*, 49(8), 1281-7.
162. Tonegawa S., Morrissey, M. D., y Kitamura, T. (2018). The role of engram cells in the systems consolidation memory. *Nature Rev Neurosci*, 19, 485-498.
163. Torres-García, M. E. (2012). Efecto de la inhibición de la transcripción en el hipocampo dorsal sobre la consolidación de la memoria de un aprendizaje incrementado. (Tesis de Maestría en Ciencias). Instituto de Neurobiología, UNAM, Juriquilla, Qro.
164. Veterinar-Anatomisches Institut. Universitat Leipzig. Recuperado el 3 de junio de 2016, de <http://anatomie.vetmed.uni-leipzig.de/external/hippocampus/index.html>
165. Verpelli, C., Piccoli, G., Zibetti, C., Zanchi, A., Gardoni, F., Huang, K., Brambilla, D., Di Luca M, Battaglioli E, y Sala C. Synaptic activity controls dendritic spine morphology by modulating eEF2-dependent BDNF synthesis. *J Neurosci*. 30(17), 5830-42

166. Viola, H., Ballarini, F., Martínez, M. C., y Moncada, D. (2014). The tagging and capture hypothesis from synapse to memory. *Prog Mol Biol Transl Sci.*, 122, 391-423.
167. Wagatsuma, A., Okuyama, T., Sun, T., Smith, L. M., Abe, K, y Tonegawa, S. (2018). Locus coeruleus input to hippocampal CA3 drives single-trial learning of a novel context. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 115(2), E310-E316.
168. Wang, H., Pineda, V.V., Chan, G.C, Wong, S.T., Muglia, L.J., y Storm, D.R. (2003). Type 8 adenylyl cyclase is targeted to excitatory synapses and required formossy fiber long-term potentiation. *J. Neurosci*, 23, 9710–9718.
169. Washbourne, P., Dityatev, A., Scheiffele, P., Biederer, T., Weiner, J. A., Christopherson, K. S., y El-Husseini, A. (2004). Cell adhesion molecules in synapse formation. *J Neurosci*, 24, 9244-9249.
170. Wiera, G., y Mozrzymas, J. W. (2015). Extracellular proteolysis in structural and functional plasticity of mossy fiber synapses in hippocampus. *Front Cell Neurosci*, 9 (427), 1-21.
171. Wiltgen, B. J., y Tanaka, K. Z. (2013). Systems consolidation and the content of memory. *Neurobiol Learn Mem*, 106, 365-371.
172. Whitlock, J. R., Heynen, A. J., Shuler, M. G. y Bear, M. F. (2006). Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science*, 313, 1093–1097.
173. Yamamoto, J., y Tonegawa, S. (2017). Direct medial entorhinal cortex input to hippocampal CA1 is crucial for extended quiet awake replay. *Neuron* 96, 217–227
174. Yarmolinsky, D. A., Zuker, Ch. S., y Ryba, N. J. P. (2009). Common sense about taste: from mammals to insects. *Cell*, 139 (2), 234-244.
175. Yassa, M. A., y Stark, C. E. (2011). Pattern separation in the hippocampus. *Trends Neurosci*, 34, 515–525.

176. Ying, S-W., Futter, M., Rosenblum, K., Webber, M. J., Hunt, S. P., Bliss, T. V. y Bramham, C. R. (2002). Brain-derived neurotrophic factor induces long-term potentiation in intact adult hippocampus: requirement for ERK activation coupled to CREB and upregulation of Arc synthesis. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*, 22, 1532–1540.
177. Yoshino, M., Sawada, S., Yamamoto, Ch., y Kamiya, H. (1996). A metabotropic glutamate receptor agonist DCG-IV suppresses synaptic transmission at mossy fiber pathway of the guinea pig hippocampus. *Neurosci Lett*, 207, 70-72.
178. Zagrebelsky, M., Gödecke, N., Remus, A., y Korte, M. (2018). Cell type-specific effects of BDNF in modulating dendritic architecture of hippocampal neurons. *Brain Struct Funct*. Jul 18, 1-21.
179. Zhang, B., Chuang, K. H., Ci'en, T., Chen, W. C., Sheu, F. S., y Routtenberg, A. (2016). Spatial memory training induces morphological changes detected by manganese enhanced MRI in the hippocampal CA3 mossy fiber terminal zone. *Neuroimage*, 128, 227-237.
180. Zhang, N., y Houser, C. R. (1999). Ultrastructural localization of dynorphin in the dentate gyrus in human temporal lobe epilepsy: a study of reorganized mossy fiber synapses. *J Comp Neurol*, 405, 472– 490.

11. ANEXO 1

El anexo 1 corresponde al artículo de investigación en el que se reportan los hallazgos correspondientes a la fase I del presente estudio, en la que se analiza la participación del BDNF sobre el fortalecimiento de la memoria de aversión al sabor.

Referencia:

Martínez-Moreno, A., Rodríguez-Durán, L. F., Escobar, M. L. (2016). Brain-derived neurotrophic factor into adult neocortex strengthens a taste aversion memory. *Behav Brain Res.*, 297,1-4. doi: 10.1016/j.bbr.2015.09.034.



Short communication

Brain-derived neurotrophic factor into adult neocortex strengthens a taste aversion memory



Araceli Martínez-Moreno, Luis F. Rodríguez-Durán, Martha L. Escobar*

División de Investigación y Estudios de Posgrado, Facultad de Psicología, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., Mexico

HIGHLIGHTS

- Infusion of BDNF into the IC converts a weak CTA into a strong one.
- The BDNF strengthening of CTA memory is dependent on the activation of TrkB receptors.
- BDNF into the adult neocortex is sufficient to increase an aversive memory-trace.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 August 2015
 Received in revised form
 23 September 2015
 Accepted 25 September 2015
 Available online 1 October 2015

Keywords:

BDNF
 CTA
 Memory enhancement

ABSTRACT

Nowadays, it is known that brain derived neurotrophic-factor (BDNF) is a protein critically involved in regulating long-term memory related mechanisms. Previous studies from our group in the insular cortex (IC), a brain structure of the temporal lobe implicated in acquisition, consolidation and retention of conditioned taste aversion (CTA), demonstrated that BDNF is essential for CTA consolidation. Recent studies show that BDNF-TrkB signaling is able to mediate the enhancement of memory. However, whether BDNF into neocortex is able to enhance aversive memories remains unexplored. In the present work, we administrated BDNF in a concentration capable of inducing *in vivo* neocortical LTP, into the IC immediately after CTA acquisition in two different conditions: a "strong-CTA" induced by 0.2 M lithium chloride *i.p.* as unconditioned stimulus, and a "weak-CTA" induced by 0.1 M lithium chloride *i.p.* Our results show that infusion of BDNF into the IC converts a weak CTA into a strong one, in a TrkB receptor-dependent manner. The present data suggest that BDNF into the adult insular cortex is sufficient to increase an aversive memory-trace.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) has been considered as a potent protein regulated by neuronal activity that is necessary for the expression and persistence of long-term synaptic plasticity in the adult brain [1,2]. The insular cortex (IC) is a region of the temporal cortex implicated in the storage of conditioned taste aversion (CTA), a well-established learning and memory paradigm in which an animal learns to associate a novel taste with nausea [3], in a BDNF-dependent manner [4]. Previous studies from our group have demonstrated that infusion of BDNF into the IC of adult rats leads to an *in vivo* long-lasting potentiation of the basolateral nucleus of the amygdala (Bla) to the IC pathway [5]. Additionally, we showed that infusion of BDNF into the IC prior to training in CTA modifies its extinction [6], in a manner dependent of mitogen-activated protein

kinase (MAPK) and phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) pathways [7]. Moreover, BDNF is able to reverse the CTA-memory deficit produced by inhibition of protein synthesis when this neurotrophin was infused 20 m before or 5 and 7 h after the taste-malaise association [8,9]. Recent studies have demonstrated that some of the emerging cognitive enhancers increase the activity and expression of BDNF-TrkB signaling pathways [10–12]. In this context, it has been reported that transgenic neuronal overexpression of tissue-type plasminogen activator (tPA), an extracellular serine protease implicated in the conversion of BDNF precursor (proBDNF) to mature BDNF, enhanced and prolonged both hippocampal LTP and hippocampus-dependent spatial memory [13]. Similarly, a recent study demonstrates that the increase of contextual fear memory by glucocorticoid hormones occurred through the tPA-BDNF-TrkB signaling pathways [14]. In the present study, we explored if the BDNF infusion into the IC is able to strengthen CTA memory.

Forty-three male Wistar rats weighting 350–380 g were used for the present study. All rats were caged individually and kept

* Corresponding author at: División de Investigación y Estudios de Posgrado, Facultad de Psicología, Universidad Nacional Autónoma de México, C.P. 04510 México D.F., Mexico. Fax: +52 55 56222310.

E-mail address: mescobar@unam.mx (M.L. Escobar).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2015.09.034>

0166-4328/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

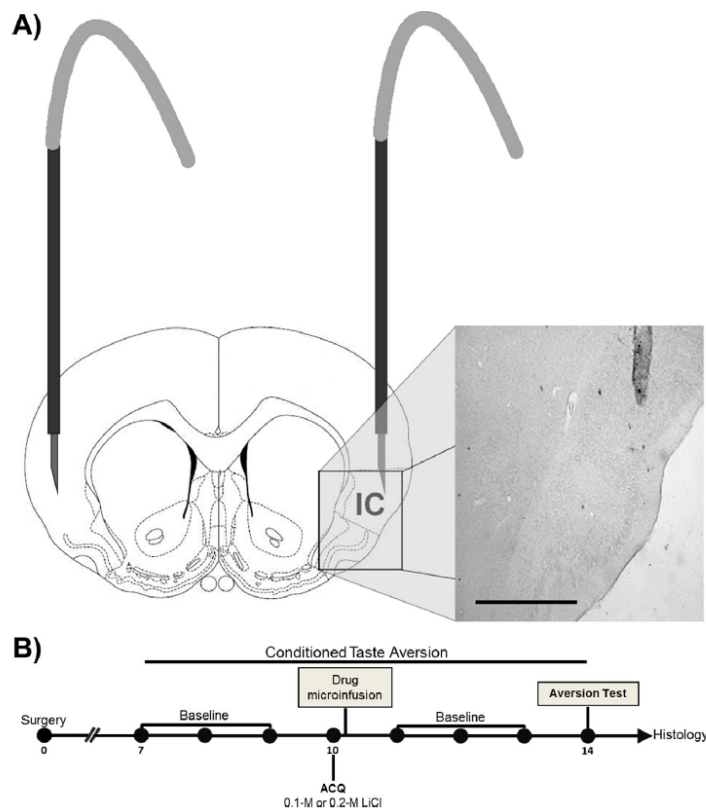


Fig. 1. Schematic representation of the experimental procedure. (A) Representation of the guide cannulae and microinjector placement in a coronal plane with a coronal section showing the microinjector location. (B) Diagram of the experimental procedure. Abbreviations: ACQ: acquisition; LiCl: lithium chloride; IC: insular cortex. Scale bar: 1 mm.

on a 12:12 light–dark cycle at 22 °C with food and water available ad libitum unless noted otherwise. Experiments were performed in accordance with the Norma Oficial Mexicana and with the approval of the Local Animal Care Committee.

Animals were implanted bilaterally with stainless steel cannulae (23-gauge) under anesthesia (Pentobarbital, 50 ml/kg i.p.). The tips of the guide cannulae were aimed at 2 mm above the IC [9]. Microinjections were delivered through dental needles as microinjectors (30-gauge) that extended 2 mm below the previously implanted guide cannulae (reaching the IC area). Dental needle microinjectors were attached by polyethylene tubing to a 10- μ l Hamilton syringe driven by a microinfusion pump (Cole Parmer Co., Vernon Hills, IL, USA). After surgery animals were allowed to recover for 7 days. All groups were histologically analyzed in order to verify the injector tip location.

Rats were placed on a water deprivation schedule, allowing access to water twice a day from a graduated cylinder, during 10 min trials for 3 days. On the acquisition day saccharin solution 0.1% (Sigma, St. Louis, MO) was available instead of water, and 10 min later, rats received 7.5 ml/kg i.p. either of 0.2-M or 0.1-M solution of LiCl, in order to induce digestive malaise. After three more days of baseline consumption, water was substituted newly by a 0.1% saccharin solution to test the aversion. The reduction of saccharin consumption was used as a measure of the strength of aversion.

In order to evaluate the effect of IC microinfusion of BDNF on CTA memory, animals were divided into the following treatment

groups: wCTA group (“weak” CTA, $n=10$), which received 0.1 M solution of LiCl i.p. on the acquisition day [15,16]; sCTA group (“strong” CTA, $n=9$) which on the acquisition day received 0.2 M solution of LiCl i.p. [7,9]; wCTA + BDNF ($n=8$), which received the same treatment as the wCTA group followed immediately by a microinfusion of BDNF in a concentration capable of inducing a long-lasting enhancement of synaptic efficacy in the Bla-IC pathway (2 μ g/2 μ l per side, 1 μ l/min; Alomone Labs) in phosphate buffer saline (PBS) as vehicle [17]; wCTA + PBS ($n=7$) which, under the same conditions as the wCTA + BDNF group received an intracortical microinfusion of PBS (2 μ l per side, 1 μ l/min); wCTA + BDNF + K ($n=9$) which, under the same conditions as the wCTA + BDNF group received an intracortical microinfusion of BDNF in combination with K252a, an inhibitor of Trk receptors (2 μ g of BDNF/2 μ l of K252a, 20 μ M, 1 μ l/min; Alomone Labs) [5,7].

Upon completing the behavioral experiments, cannulated animals were histologically analyzed in order to verify the injector tip location. Histological examinations revealed that injectors were correctly placed in the IC for all groups. Animals with unclear cannula placements were discarded (Fig. 1).

No significant differences were found among groups neither in the baseline water intake nor during the CTA acquisition session. The average baseline means (\pm SEM) of water intake were (in ml): 17.39 \pm 0.94, 19.27 \pm 0.77, 18.83 \pm 0.95, 18.50 \pm 0.73 and 17.03 \pm 0.88 for each of the wCTA, sCTA, wCTA + BDNF, wCTA + PBS and wCTA + BDNF + K groups, respectively. However, during the aversion test two-way ANOVA for saccharin consumption revealed

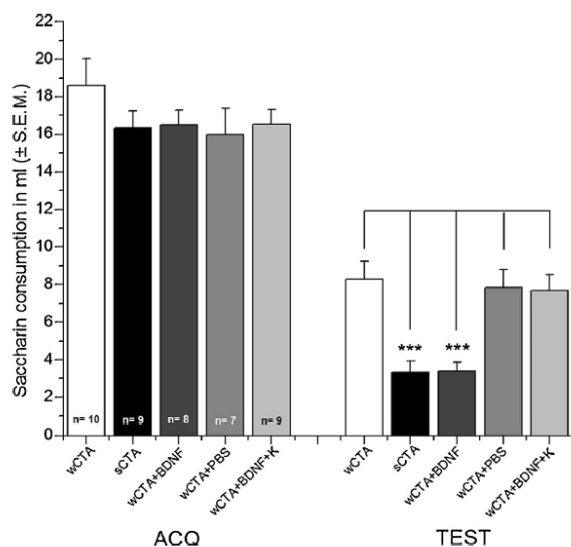


Fig. 2. Brain-derived neurotrophic factor transforms a weak CTA memory into a strong one. Acute intracortical microinfusion of BDNF leads to a weak CTA to become into a strong one. Animals were trained in a strong (sCTA) or a weak (wCTA) CTA and received intracortical infusion of BDNF (wCTA+BDNF), PBS (wCTA+PBS) or a combination of BDNF and K252a (wCTA+BDNF+K). *** $p < 0.001$.

significant differences among groups, ($F_{4,38} = 4.49$, $p < 0.01$). Post-hoc analysis with Fisher's test, showed that sCTA group presented a higher taste aversion in comparison with wCTA group ($p < 0.001$). Interestingly, no significant differences were observed between the sCTA and the wCTA+BDNF group, showing that IC-BDNF microinfusion converts a weak CTA into a strong one. Nevertheless, wCTA+PBS and wCTA+BDNF+K groups did not differ with respect to wCTA group, showing that the taste aversion enhancement elicited by BDNF infusion is dependent on BDNF-TrkB receptor interaction (Fig. 2). The present results demonstrate that intracortical BDNF infusion enhances the CTA memory-trace.

BDNF has emerged as an important protein involved in the regulation of activity-dependent plasticity in the mammalian central nervous system. Recently, it has been proposed that the increase of this neurotrophin contributes to memory enhancement [11,18,19]. Our present results revealed that administration of BDNF into the IC of adult rats that undergo weak CTA-training elicits a strong-CTA in a Trk receptor-dependent manner.

In a study carried out in the amygdala, Rattiner and coworkers demonstrated that fear conditioning training increases the TrkB phosphorylation as well as the BDNF levels [20]. More recently, Ma and collaborators showed that BDNF infusion into the central amygdala enhances CTA learning [4]. Previously, it has been observed that BDNF levels correlate with working memory performance [21], underlining the participation of this neurotrophin in the strengthening of memory. Our present results show that BDNF into the neocortex is important for the CTA formation, and suggest that the magnitude of CTA is dependent on the BDNF levels into the IC.

The same concentration of BDNF used in the present work is able to induce an in vivo lasting potentiation of synaptic efficacy at the Bla-IC pathway [5] and reverses the deficit in CTA memory elicited by protein synthesis inhibition [9]. Those evidences support the notion that BDNF is a key element of the synaptic signaling that underlay learning and memory processes, and that an increase of this neurotrophin correlates with the enhancement of memory. In

the same order of ideas, a number of studies have demonstrated that cognitive enhancers, compounds that facilitate the induction or increase the stability of synaptic plasticity, activate the BDNF-TrkB interaction [10,18,22,23].

The present results show that the BDNF strengthening of CTA memory is dependent on the activation of TrkB receptors. In this regard, our previous studies in the IC show that BDNF-TrkB receptor cascade contributes to memory-related functions performed by the IC [6,7]. Particularly, intracortical microinfusion of BDNF prior to CTA training modifies the extinction of this task [6], in a mitogen-activated protein kinase (MAPK) and phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) dependent manner [7]. These molecular pathways converge in the activation of transcription factors, such as cAMP response element-binding protein (CREB), which promotes the activation of immediate-early genes such as Zif 286 and Arc, critically involved in regulating learning and memory processes [24].

The present results demonstrate that BDNF administration into the adult IC, in a concentration able to induce long-lasting potentiation of synaptic efficacy at the Bla-IC projection, is sufficient to enhance a taste aversion memory trace.

Acknowledgement

This research was supported by PAPIIT IN212013.

References

- [1] P. Bekinschtein, M. Cammarota, C. Katze, L. Slipczuk, J.I. Rossato, A. Goldin, I. Izquierdo, J.H. Medina, BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105 (2008) 2711–2716.
- [2] P.T. Pang, H.K. Teng, E. Zaitsev, N.T. Woo, K. Sakata, S. Zhen, K.K. Teng, W.H. Yung, B.L. Hempstead, B. Lu, Cleavage of pro BDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity, *Science* 306 (2004) 487–491.
- [3] F. Bermúdez-Rattoni, The forgotten insular cortex: its role on recognition memory formation, *Neurobiol. Learn Mem.* 109 (2014) 207–216.
- [4] L. Ma, D.D. Wang, T.Y. Zhang, H. Yu, Y. Wang, S.H. Huang, F.S. Lee, Z.Y. Chen, Region-specific involvement of BDNF secretion and synthesis in conditioned taste aversion memory formation, *J. Neurosci.* 31 (6) (2011) 2079–2090.
- [5] M.L. Escobar, Y. Figueroa-Guzmán, A. Gómez-Palacio-Schjetnan, In vivo insular cortex LTP induced by brain-derived neurotrophic factor, *Brain Res.* 991 (2003) 274–279.
- [6] D.V. Castillo, Y. Figueroa-Guzmán, M.L. Escobar, Brain-derived neurotrophic factor enhances conditioned taste aversion retention, *Brain Res.* 1067 (2006) 250–255.
- [7] D.V. Castillo, M.L. Escobar, BDNF reverses the CTA memory deficits produced by inhibition of protein synthesis, *Behav. Brain Res.* 217 (2011) 248–252.
- [8] A. Martínez-Moreno, L.F. Rodríguez-Durán, M.L. Escobar, Late protein synthesis dependent phases in CTA long-term memory: BDNF requirement, *Front Behav. Neurosci.* 5 (61) (2011) 1–6.
- [9] M. Moguel-González, A. Gomez-Palacio-Schjetnan, M.L. Escobar, BDNF reverses the CTA memory deficits produced by inhibition of protein synthesis, *Neurobiol. Learn Mem.* 90 (2008) 584–587.
- [10] F.C.F. Ip, W.Y. Fu, E.Y.L. Cheng, E.P.S. Tong, K.C. Lok, Y. Liang, W.C. Ye, N.Y. Ip, Anemostide A3 enhances cognition through the regulation of synaptic function and neuroprotection, *Neuropsychopharmacology* 40 (2015) 1877–1887.
- [11] S.A. Stern, C.M. Alberini, Mechanisms of memory enhancement, *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 5 (2013) 37–53.
- [12] R. Wang, Y.-H. Li, Y. Xu, Y.-B. Li, H.-L. Wu, H. Guo, et al., Curcumin produces neuroprotective effects via activating brain-derived neurotrophic factor/TrkB-dependent MAPK and PI-3K cascades in rodent cortical neurons, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 34 (2010) 147–153.
- [13] R. Madani, S. Hulo, N. Toni, H. Madani, T. Steimer, D. Muller, J.D. Vassalli, Enhanced hippocampal long-term potentiation and learning by increased neuronal expression of tissue-type plasminogen activator in transgenic mice, *EMBO J.* 18 (1999) 3007–3012.
- [14] J.M. Revest, A. Le Roux, V. Roullot-Lacarrière, N. Kaouane, M. Vallée, F.F. Kasanetz, F. Rougé-Pont, F. Tronche, A. Desmedt, P.V. Piazza, BDNF-TrkB signaling through Erk1/2/MAPK phosphorylation mediates the enhancement of fear memory induced by glucocorticoids, *Mol. Psychiatry* 19 (9) (2014) 1001–1009.
- [15] D.E. Berman, S. Hazvi, J. Stehberg, A. Bahar, Y. Dudai, Conflicting processes in the extinction of conditioned taste aversion: behavioral and molecular aspects of latency, apparent stagnation, and spontaneous recovery, *Learn Mem.* 10 (2003) 16–25.

- [16] M.I. Miranda, G.L. Quirarte, G. Rodríguez-García, J.L. McGaugh, B. Roozendaal, Glucocorticoids enhance taste aversion memory via actions in the insular cortex and basolateral amygdala, *Learn Mem.* 15 (2008) 468–476.
- [17] L.M. Rodríguez-Serrano, B. Ramírez-León, L.F. Rodríguez-Durán, M.L. Escobar, Acute infusion of brain-derived neurotrophic factor in the insular cortex promotes conditioned taste aversion extinction, *Neurobiol. Learn Mem.* 116 (2014) 139–144.
- [18] G. Kwon, H.E. Lee, D.H. Lee, H. Woo, S.J. Park, Q. Gao, Y.J. Ahn, K.H. Son, J.H. Ryu, A. Spicatoside, enhances memory consolidation through the brain-derived neurotrophic factor in mice, *Neurosci. Lett.* 572 (2014) 58–62.
- [19] Y.-S. Lee, A.J. Silva, The molecular and cellular biology of enhanced cognition, *Nat. Rev. Neurosci.* 10 (2009) 126–140.
- [20] L.M. Rattiner, M. Davis, C.T. French, K.J. Ressler, Brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor B involvement in amygdala-dependent fear conditioning, *J. Neurosci.* 24 (2004) 4796–4806.
- [21] H.A. Bimonte-Nelson, C.L. Hunter, M.E. Nelson, Granholm A-CE. Frontal cortex BDNF levels correlate with working memory in an animal model of Down syndrome, *Behav. Brain Res.* 139 (2003) 47–57.
- [22] G.B. Kaplan, K.A. Moore, The use of cognitive enhancers in animal models of fear extinction, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 99 (2011) 217–228.
- [23] N. Singewald, C. Schmuckermair, N. Whittlea, A. Holmes, K.J. Ressler, Pharmacology of cognitive enhancers for exposure-based therapy of fear, anxiety and trauma-related disorders, *Pharmacol. Ther.* 149 (2015) 150–190.
- [24] G. Musumeci, L. Minichiello, BDNF-TrkB signalling in fear learning: from genetics to neural networks, *Rev. Neurosci.* 22 (2011) 303–315.

12. ANEXO 2

El anexo 2 corresponde al artículo de investigación en el que se reportan los hallazgos correspondientes a la fase II del presente estudio, en la que se analiza la participación del BDNF en la modulación de la plasticidad sináptica y estructural de las fibras musgosas del hipocampo.

Referencia:

Martínez-Moreno, A., Rivera-Olvera, A., Escobar, M. L. (2018). BDNF induces in vivo late-LTP and morphological synaptic plasticity at the hippocampal mossy fibers in a transcription and translation-independent manner. (En preparación).

BDNF induces in vivo long-lasting enhancement of synaptic transmission and structural reorganization at the hippocampal mossy fibers in a transcription and translation-independent manner

Araceli Martínez-Moreno and Martha L. Escobar

División de Investigación y Estudios de Posgrado, Facultad de Psicología,

Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México

Number of pages (including references and figures captions): 33

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, Ciudad de México

México

Phone (52) (55) 56222222 ext. 41227

FAX (52) (55) 56222310

E-mail: mescobar@unam.mx

ABSTRACT

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is an essential product of protein synthesis with a prominent impact on brain signaling and synaptic plasticity. Exogenous application of this neurotrophin is able to induce long-term potentiation (LTP) in several brain structures such as the hippocampus, increasing the gene transcription and translation of proteins involved in functional and structural plasticity. In this regard, our previous studies have demonstrated that acute intrahippocampal administration of BDNF induces long-lasting enhancement of synaptic transmission at the mossy fibers projection (MF) accompanied by a structural reorganization at the CA3 hippocampus area within the stratum oriens region. In the present study, we investigate whether transcriptional and translational inhibition interferes with the persistence of the MF functional and structural synaptic plasticity elicited by BDNF in adult rats in vivo. Our results show that BDNF is able to induce a lasting potentiation of synaptic efficacy at the MF projection accompanied by a structural reorganization at the CA3 area in an mRNA synthesis and protein translation-independent manner. The present findings support the idea that BDNF is an essential plasticity related product, which is necessary and sufficient to induce and maintain functional and structural synaptic plasticity at MF-CA3 pathway.

Keywords: BDNF, LTP, structural plasticity, MF-CA3 pathway, mRNA and protein synthesis.

1. Introduction

Nowadays, it is widely accepted that learning and memory are supported by cellular mechanisms that produce changes in synaptic efficacy and morphology. Long-term potentiation (LTP) is a long-lasting enhancement of synaptic strengths that has been induced in several brain regions (Malenka and Bear, 2004; Mayford et al., 2012; Nicoll, 2017), making it a suitable phenomenon for studying the mechanisms underlying learning and memory processes. LTP is related to the persisting biochemical signals that last in the cell, like protein synthesis and early activation of transcriptional processes, as well as morphological modifications of synapses (Citri & Malenka, 2008; Nicoll, 2017). The elucidation of the molecular mechanisms that lead to this functional and morphological plasticity, recognized brain derived neurotrophic factor (BDNF) as a key protein in the induction and prevalence of such activity-dependent modifications in the adult brain (Reichardt, 2006; Bramham et al., 2007). Several studies have demonstrated that BDNF and the activation of the receptor tyrosine kinase B (TrkB) are necessary for the induction and strengthening of LTP in different brain regions (Edelmann, Lessmann and Brigadski, 2014; Leal, Afonso, Salazar, and Duarte, 2015; Kowiański et al., 2018). In addition, it has been reported that the administration of mature BDNF rescue the LTP as well as long-term memory, in the hippocampus or in the insular cortex, when protein synthesis has been inhibited by the administration of anisomycin (Pang et al., 2004; Bekinschtein et al., 2007; Moguel-González, Gómez-Palacio Schjetnan & Escobar, 2008). The evidence previously mentioned support the idea that BDNF is a plasticity-related product (PRP), according to the hypothesis of synaptic tagging and capture, where synaptic activity generates a tag which captures the plasticity-related products (PRPs) derived

outside of synapses (Govindarajan et al., 2006; Morris, 2006). In fact, various studies have indicated that BDNF is a PRP and TrkB receptor has the function of synaptic tag (Patterson et al., 1992; 2001; Pang et al., 2004; Barco et al., 2005; Lu et al., 2011). The role of BDNF in the LTP and long-term memory is in agreement with the influence that this neurotrophin exerts in the adult brain to modulate and induce morphological modifications such as dendritic complexity, spine formation and neurogenesis (Fukazawua et al., 2003; Bramham et al., 2007; Rex et al., 2007; Tanaka et al., 2008; Kuipers et al., 2016; Kowiański et al., 2017).

The hippocampal mossy fiber pathway (MF) constitutes a relevant area for learning and memory processes. The induction of LTP in the MF-CA3 pathway exhibits a form of potentiation characterized by a slow initial increase in the EPSP slope that has been related to an independence of N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) (Harris and Cotman, 1986; Nicoll and Schmitz, 2005). Likewise, MF-CA3 LTP depends on presynaptic mechanisms, is induced by the co-release of glutamate and zinc and is modulated by opioid peptides (López-García et al., 1996; Escobar et al., 1997; Terman et al., 2000; Frederickson et al., 2005; Lu et al., 2005; Huang et al., 2008). On the other hand, it has been reported that the inhibition of transcription or translation processes affects LTP at MF-CA3 pathway elicited by high frequency stimulation (HFS) (Huang et al., 1994; Barea-Rodríguez et al., 2000; Calixto et al., 2003). For instance, it has been demonstrated that the administration of the protein synthesis inhibitor anisomycin into the CA3 hippocampal region, impairs the LTP induction, meanwhile, the microinfusion of DRB (5, 6-1- β - D-ribofuranosylbenzimidazole), a specific RNA polymerase II inhibitor, disrupts the late

phase of this LTP (Hagena & Manahan-Vaughan, 2013). In our previous studies, we have reported that application of HFS or acute administration of BDNF induces a robust LTP and synaptogenesis at the MF pathway. Seven days after the electrophysiological recordings a band of Timm's staining, a frequently used marker to show MF buttons, revealed reorganization of mossy fiber connections at the stratum oriens (SO) in the CA3 hippocampal area (Escobar, et al., 1997; Gómez-Palacio-Schjetnan & Escobar, 2008; Schjetnan & Escobar, 2012).

The evidence previously referred suggests that BDNF is an essential protein which promotes and modulates functional and structural plasticity in the MF pathway. However, the role of new mRNA synthesis and protein translation in long-lasting plasticity elicited by BDNF in the CA3 region of the hippocampus has not been explored yet, and this is an important question as the CA3 area is believed to play a unique role in memory formation. In the present work we evaluated the requirement of mRNA and proteins synthesis *de novo* for the maintenance of synaptic efficacy and structural reorganization in the MF-CA3 pathway elicited by BDNF administration in adult rats *in vivo*.

2. Methods

2.1. Animals

Sixty male Wistar rats, weighing 360-390 g were used for the present study. All animals were housed individually under a 12/12 h light dark cycle at 22 °C, with food and water ad libitum. Methods were carried out in accordance with the guidelines of the Norma Oficial Mexicana (NOM-062-Z00-1999) and with the approval of the

Animal care committee of the Faculty of Psychology of the National Autonomous University of Mexico.

2.2. *In vivo electrophysiological recordings*

Electrophysiological recordings were accomplished in anesthetized rats as previously described (Ramos Languren & Escobar, 2013; Schjetnan & Escobar, 2012). Responses were recorded by using a monopolar microinfusion electrode placed in the *stratum lucidum* above the CA3 pyramidal layer of the dorsal hippocampus (Fig. 1A). Constant current stimulation (40-60 μ A monophasic pulses, 0.25 ms duration) was applied to the MF unilaterally using a stainless steel bipolar electrode. The evoked responses were stored for offline analysis using the BrainWave software (DataWave, Broomfield, CO, USA). Low frequency (0.05 Hz) responses were evoked for 20 min, after that, inhibitory drugs DRB (40 ng; 0.1 μ l/min) or ANI (100 μ g; 0.1 μ l/min) were infused and evoked responses were collected during 25 min more. At the end of the baseline period, either BDNF (2 μ g/2 μ l; 0.2 μ l/min), PBS (2 μ l; 0.2 μ l/min) or HFS (3 trains/100 Hz/1s/20 s intertrain interval) were administered and evoked responses were collected during 4 h more (Ramos Languren & Escobar, 2013; Schjetnan & Escobar, 2012). Evoked responses from CA3 were measured by obtaining the field excitatory postsynaptic potential (EPSP) slope measured 1–3 ms after the EPSP onset. MF-LTP was calculated as a percentage of change with respect to the mean slope of field potentials of the baseline period. The metabotropic glutamate receptor II agonist 2-(2, 3-dicarboxy-cyclopropyl) glycine (DCG-IV; Tocris, Ellisville, MO, USA; 0.5 μ M, 0.5 μ l per side / 0.1 μ l / min) was microinfused at the end

of the electrophysiological recordings (Fig. 1B) to verify that the signal was generated by MF inputs (Calixto, Thiels, Klann & Barrionuevo, 2003).

2.3. *Experimental design*

With the purpose of evaluate if LTP elicited by BDNF presents a dependence of protein transcription or translation, animals were divided into the following treatment groups: (1) BDNF group (n=6) which had electrodes implanted and received intrahippocampal infusion of BDNF (2 μ g/2 μ l/0.2 μ l/min; Alomone Labs, Jerusalem, Israel) prepared with phosphate-buffered saline (PBS) as vehicle in order to induce BDNF-dependent LTP (Gómez-Palacio-Schjetnan & Escobar, 2008; Schjetnan & Escobar, 2012); (2) PBS group (n = 6) which, under the same conditions as the BDNF group, received intrahippocampal infusion of PBS (2 μ l/0.2 μ l/min); (3) DRB+BDNF group (n=6) which received DRB (40 ng/0.5 μ l; 0.1 μ l/ min), 25 minutes before BDNF infusion; (4) DRB+PBS group (n=6) which under similar conditions as the DRB+BDNF group received PBS (2 μ l/0.2 μ l/min) instead of BDNF, with the aim to explore the effects of DRB on the basal transmission of the MF-CA3 pathway; (5) ANI+BDNF group (n=6) which under the same conditions as the DRB+BDNF group, received anisomycin (100 μ g/0.5 μ l/0.1 μ l/min), 25 minutes before BDNF infusion; (6) ANI+PBS group (n=6), which under similar conditions as the DRB+PBS group, received PBS (2 μ l/0.2 μ l/min) instead of BDNF, with the aim to explore the effects of anisomycin on the basal transmission of the MF-CA3 pathway; (7) CONTROL group (n=4), made up of animals that served as an intact control group used for the morphological analysis.

On the other hand, in order to evaluate in our hands the effect of protein transcription and translation inhibition over the LTP-MF induced by HFS (regarding with a previous report, Hagena & Manaha-Vaughan, 2013), animals were divided into the following groups: (1) HFS group (n=7), which underwent surgery had electrodes implanted and received HFS capable of inducing LTP; (2) DRB+HFS group (n=6) which under the same conditions of HFS group received HFS in the presence of the specific mRNA synthesis inhibitor DRB (40 ng/0.5 μ l; 0.1 μ l/min) (Prado-Alcalá, et al., 2017) microinfused in the CA3 area, 20 minutes after the start of the baseline; (3) ANI+HFS (n=7), which in the same conditions of HFS group received microinfusion of the protein synthesis inhibitor anisomycin (100 μ g/0.5 μ l/ 0.1 μ l/min; TOCRIS, Ellisville, MO; Moguel-González, Gómez-Palacio-Schjetnan & Escobar, 2008; Martínez-Moreno, Rodríguez-Durán & Escobar, 2011) (Fig. 1C).

2.4. Histological procedure

The morphological reorganization of the MF was analyzed 1 week after the electrophysiological procedure for all groups (four animals per group). Two previously reported methods were used (Ramírez-Amaya, et al., 2001; Rekart, et al., 2007; Schjetnan & Escobar, 2012; Ramos-Languren & Escobar, 2013; Juárez-Muñoz, Rivera-Olvera, Ramos-Languren & Escobar, 2017). Coronal sections of 40 μ m were processed for Timm's staining (Escobar et al., 1997; Ramírez-Amaya, et al., 2001; Rekart, et al., 2007; Schjetnan & Escobar, 2012; Ramos-Languren & Escobar, 2013; Juárez-Muñoz et al., 2017). Every fifth slice from the extreme septal pole of the dorsal hippocampus was systematically chosen for a total of six sections/animal. First, the

digitized images were analyzed by using Scion Image analysis software (Scion Corporation, Frederick, MD). The areas for the stratum oriens (SO) and stratum pyramidale (SP) were combined (SOSP) (Rekart et al., 2007; Juárez-Muñoz et al., 2017) and the area occupied by Timm's granules was measured in each image. In a complementary manner, real measurements of the same digitized images were carried out using the method described by Rekart et al. (2007). Images were coded and a point-counting grid (squares = 25 μm on a side) was digitally superimposed. Grid intersections overlying dark Timm's silver precipitate were counted as belonging either to the stratum lucidum (SL) or to the SOSP. Following the densitometric analysis by either of the two measurement methodologies, comparisons among groups were made by using the ratio of the estimated area in SOSP to the estimated area in SL to account for any size differences among individual animals (Rekart et al., 2007; Juárez-Muñoz et al., 2017).

3. Results

3.1. BDNF is sufficient to induce LTP and to produce synaptic reorganization at CA3 hippocampus area despite of the inhibition of mRNA synthesis and protein synthesis de novo

The CA3 EPSP consisted of potentials of 0.42 ± 0.02 mV (mean \pm SEM) elicited with 40-60 μA current pulses of 0.25 ms duration. These responses presented their valley

at 7 μ s with an average slope of 0.17 ± 0.01 (mean \pm SEM) (Fig. 1B). Microinfusion of DCGIV at the end of electrophysiological recordings selectively blocked MF responses to a 25% of baseline signals, verifying that the signal was generated by MF inputs (Fig. 1B).

Our results (supporting information) corroborate that acute infusion of BDNF (2 μ g/2 μ l) induced LTP that started approximately 20 min after neurotrophin infusion and reached a plateau at 1 h; whereas PBS infusion, as BDNF vehicle did not produce the effect, as previously was reported (Gómez-Palacio-Schjetnan & Escobar, 2008; 2012). Thus, considering the BDNF effects on MF synaptic efficacy, we analyzed the effect of mRNA synthesis and protein translation inhibition on MF-LTP induced by BDNF. Our results show that acute BDNF infusion into CA3 region is capable to induce long-lasting LTP, which was maintained until 4 h after neurotrophin administration, despite of the transcription and translation inhibition processes (Fig. 2A). ANOVA analysis for slope revealed significant differences between the groups for the last 20 min of the recording ($F_{5, 30} = 48.63$, $p < 0.001$). Post-hoc Fisher's analysis showed differences between BDNF, DRB+BDNF and ANI+BDNF respect to the control groups (PBS, DRB+PBS and ANI+PBS) ($p < 0.001$). The percent changes (\pm SEM) in the EPSPs slope for the groups BDNF, PBS, DRB+BDNF, DRB+PBS, ANI+BDNF and ANI+PBS groups were 164.46 ± 0.35 , 101.6 ± 0.45 , 154.18 ± 0.27 , 102.23 ± 0.5 , 141.03 ± 0.21 and 99.22 ± 0.37 , respectively.

It has been proved that functional plasticity is accompanied by morphological reorganization at the synapses and these changes understand as the stabilization of synaptic plasticity (Lynch, Rex & Gall, 2007; Poo et al., 2016). Regarding to this, our

results show that the infusion of BDNF generates a bilateral enhancement of synaptogenesis in the SOSP of the CA3 area, supported by our previous studies (Gómez-Palacio-Schjetnan & Escobar, 2008; 2012). What is more, the present study revealed that in spite of the presence of DRB or ANI, BDNF was capable to produce a bilateral increment of mossy fiber buttons, highly ipsilateral (Fig. 2B). Intact control and PBS groups, presented mossy fibers buttons almost exclusively in the SL of the CA3 area (Fig. 2B a y b, e y f) in agreement with previous studies (Escobar, Barea-Rodríguez, Derrick, Reyes & Martínez, 1997; Ramírez-Amaya et al., 2001; Rekart, Sandoval, Bermudez-Rattoni & Routtenberg, 2007). ANOVA of the average Timm positive surface area revealed significant differences between groups ($F_{6, 35} = 34.5$, $p < 0.0001$). Furthermore, post-hoc analysis with Fisher's test showed that the groups BDNF, DRB+BDNF and ANI+BDNF had a significantly larger area of ipsilateral synaptogenesis in the CA3 hippocampal region in comparison with the groups CONTROL, PBS, DRB+PBS and ANI+PBS (Fig. 2C). Similar results were obtained by the measures performed with the point counting grid, where ANOVA also presented significant differences between groups ($F_{6, 35} = 28.64$, $p < 0.0001$). These results revealed that the acute administration of BDNF is capable and sufficient to produce functional plasticity and structural reorganization at MF buttons in spite of the inhibition of both, mRNA synthesis and proteins synthesis *de novo*.

3.2. *The inhibition of genic transcription and protein translation affects MF-LTP induced by HFS and blocks the morphological reorganization*

According to previous studies, our results show that the application of HFS induces LTP at the MF pathway in adult rats, in vivo, (Schjetnan & Escobar, 2012; Hagen & Manaha-Vaughan, 2013; Juárez-Muñoz et al., 2017). MF-LTP is characterized by a slow increment in the EPSP slope, related to the independence of NMDA receptors activation (Derrick et al., 1991; Escobar et al., 1997). Under mRNA synthesis inhibitory condition, due to DRB microinfusion in the CA3 area, HFS delivery induces but not maintains LTP. On the other hand, the induction of LTP by delivery of HFS was blocked in presence of ANI (a reversible and specific protein synthesis inhibitor) (Fig. 3A). Repeated-measures ANOVA analysis for slope revealed significant differences between groups 60 min after HFS delivery ($F_{2, 17} = 32.8, p < 0.001$). Post-hoc analysis with Fisher's test showed significant differences ($p < 0.001$) between groups HFS and DRB+HFS in comparison with ANI+HFS 60 min after HFS delivery. The percent changes (\pm SEM) in the EPSPs slope for the groups HFS, DRB+HFS and ANI+HFS at this time was, 134.27 ± 0.37 , 121.45 ± 0.30 and 101.89 ± 0.24 respectively. Moreover, statistical analysis at the end of the recordings revealed significant group differences ($F_{2, 17} = 45.9, p < 0.001$). Post-hoc Fisher's analysis showed that HFS group presented significant differences respect to the rest of groups ($p < 0.001$). The percent changes (\pm SEM) in the EPSPs slope for the groups HFS, DRB+HFS and ANI+HFS the last 20 min of the recording were 144.66 ± 0.54 , 100.46 ± 0.32 and 103.12 ± 0.23 respectively. These results suggest that mRNA synthesis is required

for the maintenance of MF-LTP; meanwhile the protein synthesis *de novo* is necessary for the induction of LTP at MF-CA3 pathway.

Our morphological analysis of this part show that high frequency mossy fiber stimulation produces a bilateral increment of hippocampal mossy fiber buttons, with a prominent contralateral enhancement visualized by Timm's stained density at the SOS (stratum oriens/pyramidal) of the CA3 area, in agreement with our previous studies (Gómez-Palacio-Schjetnan & Escobar, 2012; Ramos-Languren & Escobar; Juárez-Muñoz et al., 2017). However, we demonstrated for the first time that under protein transcription and translation inhibition, the effect of HFS on morphological reorganization was impaired (Fig. 3B c-h). ANOVA of the average Timm positive surface area obtained by quantitative densitometric analysis of the SOS from each animal, revealed significant differences between groups ($F_{3, 20} = 16.22, p < 0.0001$). Post-hoc analysis with Fisher's test ($p < 0.0001$) show that the group HFS showed a significantly larger area contralateral Timm-stained granules compared to the other groups. Similar results were obtained by the measures performed with the point counting grid, where ANOVA also presented significant differences between groups ($F_{3, 20} = 30.9, p < 0.001$) (Fig. 3C). These results suggest that like functional plasticity, the structural plasticity induced by HFS needs of mRNA synthesis and protein synthesis *de novo* for the synaptogenesis in the CA3 hippocampus area.

3. Discussion

BDNF has been proposed as an essential protein for the memory maintenance because its activity-dependent secretion may support synapse-specific synthesis of

proteins that are required for the stability of long-term forms of synaptic plasticity (Lu, Christian & Lu, 2008; Bramham et al., 2007; Park and Poo, 2013). In this regard, it is known that the hippocampal mossy fiber pathway contains the highest levels of BDNF protein in the central nervous system (Danzer & McNamara, 2004; Bramham & Messaoudi, 2005) suggesting that BDNF is a key regulator of synaptic plasticity in this region. Likewise, several evidence has shown that exogenous application of this neurotrophin induces a robust long-lasting enhancement of synaptic transmission in several hippocampal areas (Kang & Schuman, 1995, Messaoudi et al., 2002; Gómez-Palacio-Schjetnan & Escobar, 2008; Gómez-Palacio-Schjetnan & Escobar, 2012; Graves et al., 2016), emphasizing the importance of BDNF in the modulation of long-lasting synaptic interactions, which are critical for cognition and memory. Added to this, in a previous study carried out by our research group we revealed that acute infusion of BDNF was sufficient to induce LTP in the DG-CA3 projection accompanied by structural reorganization at the MF pathway (Gómez-Palacio-Schjetnan & Escobar, 2008; Schjetnan & Escobar 2012). In the present work we show that the enhancement of synaptic efficiency and the structural modifications elicited by BDNF at MF pathway are produced in an mRNA synthesis and protein translation-independent manner.

BDNF is considered an essential product of protein synthesis with multipotent impact on brain signaling and synaptic plasticity through the activation of cytoplasmic signaling pathways including mitogen-activated protein kinase (MAPK), phospholipase C-gamma (PLC-gamma) and phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-K) (Minichiello et al., 2002; Bekinschtein, Cammarota, Izquierdo & Medina, 2008; Kowiański et al., 2018). Through these cascades, BDNF exerts a direct impact on synaptic efficacy,

modulating the acquisition and storage of information (Bekinschtein et al., 2008; Tyler, Alonso, Bramham, & Pozzo-Miller, 2002). The activation of these signal transduction cascades converges in the activation of transcription factors, such as cAMP response element-binding protein (CREB), which induce gene expression (e.g. Arc and Zif 286) and thereby long-lasting synaptic changes (Bramham, 2007; Minichiello et al., 2002; Ying et al., 2002; Kowiański et al., 2018). In this regard, the results of the present study revealed that the acute infusion of BDNF does not need of protein synthesis or mRNA synthesis *de novo* to induce and maintain LTP at MF pathway, which is opposed to the results obtained with HFS delivery. Our findings support the idea that BDNF is an essential molecule, sufficient and necessary for the establishment of synaptic plasticity (Pang et al., 2004; Schjetnan & Escobar, 2012; Martínez-Moreno, Rodríguez-Durán, Escobar, 2017). In agreement with this, an early study carried out by Kang and Schuman also showed that BDNF was able to induce LTP in the CA1 region of the hippocampus in the absence of protein synthesis (Kang & Schuman, 1996). On the other hand, Takei and collaborators found that BDNF was able to increase protein synthesis in cortical neurons by up-regulating the translation initiation via multiple signaling pathways including PI3-K, Akt and MAPK (Takei, Kawamura, Hara, Yonezawa & Nawa, 2001).

In the context of “synaptic tagging and capture” theory, several evidences propose that BDNF is a plasticity-related product (PRP) and TrkB receptor is proposed as a “synaptic tag” (Patterson et al., 1992; 2001; Frey & Morris, 1997; Barco et al., 2005; Pang et al., 2004; Lu et al., 2011). Accordingly, a pioneer study showed that in hippocampal slices stimulated with a weak theta burst stimulation (TBS), which normally is able to induce only an early-LTP (E-LTP), the administration of BDNF

resulted in a sustained late-LTP (L-LTP) (Frey et al., 1996). In this context, Pang and collaborators showed that exogenous BDNF was sufficient to rescue L-LTP in the Shaffer collateral pathway when protein synthesis was inhibited (Pang et al., 2004). In the same way, a recent work of our group proved that the acute infusion of this neurotrophin in the insular cortex is able to strengthen an aversive taste memory (Martínez-Moreno, Rodríguez-Durán & Escobar, 2017). Thus, the above supports the notion that BDNF does not need of transcription or translation process, because is sufficient to induce and maintain the synaptic plasticity by itself.

Nowadays, changes in synaptic morphology as a result of activity are believed to sustain synaptic plasticity stabilization (Lynch et al., 2007) and the elucidation of the molecular mechanisms that lead to functional and morphological plasticity recognized BDNF as a key protein in the induction and prevalence of such activity-dependent modifications in the adult brain (Bramham, 2007). In this respect, we previously reported that *in vivo* HFS delivery or BDNF infusion to hippocampal CA3 area induce a bilateral increment of MF buttons in the stratum oriens region, preferentially contralateral (Escobar et al., 1997; Gomez-Palacio-Schjetnan and Escobar, 2008; Schjetnan & Escobar, 2012). In the present study we show that the administration of BDNF, in the presence of transcription and translation inhibitors, was sufficient to modify the synaptic organization pattern, promoting a bilateral augmentation of MF buttons, prominently ipsilateral. Supporting our results, previous studies have reported that HFS or acute BDNF infusion enhance synaptic efficiency which comes with an increment of BDNF-mRNA levels and structural reorganization (Derrick et al., 1991; Bramham et al., 1996; Escobar et al., 1997; Scharfman, Goodman, Sollas & Croll, 2002; Gómez-Palacio Schjetnan & Escobar, 2008; Schjetnan & Escobar, 2012).

On the other hand, it has been observed that BDNF modulate dendritic and spine architecture and its blocking results in a significant reduction in dendritic spine density, associated with a decrease in F-actin levels within spine head (Kellner et al., 2014). The fact that MF synaptogenesis occurred bilaterally means that the plasticity effect induced by HFS or by BDNF, affects neuronal firing patterns in the hippocampal network through the activation of commissural pathway, involving the activation of hilar mossy cells. These cells project back to the inner molecular layer of both ipsi and contralateral DG, contributing to MF activity regulation (Henz, Urban & Barrionuevo, 2000; Hashimoto et al., 2017).

In addition to the above, it is known that LTP displays different requirements of protein translation and transcription depending on both the hippocampal subregion investigated and the mechanism for which it was generated (Henze et al., 2000). In this regard, extensive evidence has revealed that the induction of MF-LTP elicited by HFS is blocked due to the protein synthesis inhibition, whereas the inhibition of the mRNA synthesis *de novo* disrupts the long-phase of LTP (Huang, Li & Kandel, 1994; Barea-Rodríguez, Rivera, Jaffe & Martínez, 2000; Calixto, Thiels, Klann & Barrionuevo, 2003; Hagen & Manahan-Vaghan, 2013). In agreement with the above, in the present work we showed that under the effect of anisomycin (a protein synthesis *de novo* inhibitor), the delivery of HFS was unable to induced MF-LTP; while under the effect of DRB (a reversible and specific mRNA synthesis inhibitor), HFS allowed the induction but not the maintenance of MF-LTP, which returned to basal levels 2 h after the delivery. The fact that protein synthesis is required for the induction of LTP at MF pathway is in contrast with broad evidence that indicates that the early phase of LTP is independent-on protein synthesis and mRNA (Bliss &

Collingridge; Malenka & Bear, 2004). However, it is well known that MF-LTP requires of particular molecular mechanisms unlike other brain structures, even in the hippocampus itself (Nicoll & Schmitz, 2005; Hyung-Bae & Castillo, 2008; Hashimoto et al., 2017). On the other hand, it has been proved that HFS triggers the synthesis of new proteins within minutes (Lynch, Voss, Rodríguez & Bliss, 1994; Ouyang et al., 1999) and there is an up regulation of mRNA synthesis 30 min after synaptic plasticity induction (Morimoto et al., 1998; French et al., 2001; Saha et al., 2011). This would in turn explain a need for rapid protein translation and a requirement of protein transcription for the stabilization of LTP in the MF pathway. Furthermore, in the present work we revealed for first time that morphological reorganization induced by HFS in the MF was prevented by the inhibition of transcription and translation processes, unlike what happens with the administration of BDNF in the same region.

In summary, the present study showed for the first time that the long-lasting enhancement of synaptic transmission and structural reorganization elicited by BDNF at the hippocampal mossy fibers, are independent on-transcription and translation processes, suggesting that BDNF is a potent molecule capable to induce functional and structural synaptic plasticity by itself.

References

Barco A, Patterson S, Alarcon JM, Gromova P, Mata-Roig M, Morozov A, & Kandel ER. (2005). Gene expression profiling of facilitated L-LTP in VP16-CREB mice reveals that BDNF is critical for the maintenance of LTP and its synaptic capture. *Neuron*, 48,123–137.

Barea-Rodríguez, E. J., Rivera, D. T., Jaffe, D. B. & Martinez, J. L., Jr. (2000). Protein synthesis inhibition blocks the induction of mossy fiber long-term potentiation in vivo. *Journal of Neuroscience*, 20, 8528–8532.

Bekinschtein, P., Cammarota, M., Igaz, L. M., Bevilaqua, L., R., Izquierdo, I. & Medina, J. H. (2007). Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. *Neuron*, 53(2), 261-77.

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. *J Comp Neurol*, 368, 371–382.

Bramham, C.R. (2007). Control of synaptic consolidation in the dentate gyrus: mechanisms, functions, and therapeutic implications. *Progress in Brain Research*, 163, 453–471.

Calixto, E., Thiels, E., Klann, E. & Barrionuevo, G. (2003). Early maintenance of hippocampal mossy fiber-long-term potentiation depends on protein and RNA

synthesis and presynaptic granule cell integrity. *Journal of Neuroscience*, 23, 4842–4849.

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

Conner, J. M, Lauterborn, J. C., Yan, Q., Gall, C. M. & Varon, S. (1997). Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. *Journal of Neuroscience*, 17, 2295–2313.

Davis HP, Squire LR (1984) Protein synthesis and memory: a review. *Psychological Bulletin*, 96, 518–559.

Drake, C. T., Milner, T. A. & Patterson, S. L. (1999). Ultrastructural localization of full-length trkB immunoreactivity in rat hippocampus suggests multiple roles in modulating activity-dependent synaptic plasticity. *Journal of Neuroscience*, 19, 8009–8026.

Escobar, M. L., Barea-Rodríguez, E. J., Derrick, B. E., Reyes, J. A. & Martinez, J. L, Jr. (1997). Opioid receptor modulation of mossy fiber synaptogenesis: independence from long-term potentiation. *Brain Research*, 75, 330–335.

Frederickson, C. J., Koh, J-Y & Bush, A. I. (2005). The neurobiology of zinc in health and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 6, 449–462.

French, P.J., O'Connor, V., Jones, M. W., Davis, S., Errington, M.L., Voss, K... (2001). Subfield-specific immediate early gene expression associated with hippocampal long-term potentiation *in vivo*. *European Journal of Neuroscience*, 13, 968–976.

Frey, U. & R. G. Morris (1997). "Synaptic tagging and long-term potentiation." *Nature*, 385(6616), 533-536.

Frey, U., Krug, M., Reymann, K. G., & Matthies, H. (1988). Anisomycin, an inhibitor of protein synthesis, blocks late phases of LTP phenomena in the hippocampal CA1 region *in vitro*. *Brain Research*, 452, 57–65.

Fukazawa, Y., Saitoh, Y., Ozawa, F., Ohta, Y., Mizuno, K. & Inokuchi, K. (2003). Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the dendritic spine that is essential for late LTP maintenance *in vivo*. *Neuron* 38, 447–460.

Gómez-Palacio-Schjetnan, A. & Escobar, M. L. (2008). In vivo BDNF modulation of adult functional and morphological synaptic plasticity at hippocampal mossy fibers. *Neuroscience Letters*, 445, 62–67.

Govindarajan, A., Kelleher, R., J., & Tonegawa S. (2006). A clustered plasticity model of long-term memory engrams. *Nature Reviews Neuroscience*, 7, 575–583.

Hagena H, & Manahan-Vaughan D. (2011). Learning-facilitated synaptic plasticity at CA3 mossy fiber and commissural-associational synapses reveals different roles in information processing. *Cerebral Cortex*, 21(11), 2442-9

Hagena, H. & Manahan-Vaughan, D. (2013). Differentiation in the protein synthesis-dependency of persistent synaptic plasticity in mossy fiber and associational/commissural CA3 synapses *in vivo*. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, 7 (10), 1-12.

Harris, E. W. & Cotman, C. W. (1986). Long-term potentiation of guinea pig mossy fiber responses is not blocked by N-methyl D-aspartate antagonists. *Neuroscience Letters*, 70, 132–137.

Henze, D., A, Urban, N., N., & Barrionuevo G. (2000). The multifarious hippocampal mossy fiber pathway: a review. *Neuroscience*, 98 (3), 407-27.

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

Huang, Y. Z., Pan, E., Xiong, Z-Q & McNamara, J. O. (2008). Zinc-mediated transactivation of TrkB potentiates the hippocampal mossy fiber-CA3 pyramid synapse. *Neuron*, 57, 546–558.

Izquierdo I, Barros DM, Izquierdo L, Mello e Souza T, Souza M, & Medina JH (1998) Mechanisms for memory types differ. *Nature*, 393, 635–636.

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

Juárez-Muñoz, Y., Rivera-Olvera, A., Ramos-Languren, L.E, & Escobar, M.L. (2017). CaMKII requirement for the persistence of in vivo hippocampal mossy fiber synaptic plasticity and structural reorganization. *Neurobiology of Learning and Memory*, 139, 56-62.

Kandel, E.R. (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 268, 1030–1038.

Kang, H. & Schuman, E. M. (1995). Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus. *Science*, 267, 1658–1662.

Korte, M., Carroll, P., Wolf, E., Brem, G., Thoenen, H. & Bonhoeffer, T. (1995) Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 92(19), 8856-60.

Krug, M., Lössner, B., & Ott, T. (1984). Anisomycin blocks the late phase of long-term potentiation in the dentate gyrus of freely moving rats. *Brain Research Bulletin*, 13, 39–42.

Kuipers, S. D., Trentani, A., Tiron, A., Mao, X., Kuhl, D., Bramham, C. R. (2016). BDNF-induced LTP is associated with rapid Arc/Arg3.1-dependent enhancement in adult hippocampal neurogenesis. *Science Report*, 6:21222.

Leal G, Comprido D, & Duarte CB. (2014). BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity. *Neuropharmacology*, 76, 639-56.

Liao, L., Pilotte, J., Xu, T., Wong, C. C. L., Edelman, G. M., Vanderklish, P. & Yates, J. R. (2007). BDNF induces widespread changes in synaptic protein content and up-regulates components of the translation machinery: an analysis using high-throughput proteomics. *Journal of Proteome Research*, 6, 1059–1071.

López-García, J. C, Arancio, O., Kandel, E. R. & Baranes, D. (1996). A presynaptic locus for long-term potentiation of elementary synaptic transmission at mossy fiber synapses in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 93, 4712–4717.

Lu Y, Ji Y, Ganesan S, Schloesser R, Martinowich K, Sun M, Mei F, Chao MV, Lu B. (2011). TrkB as a potential synaptic and behavioral tag. *Journal of Neuroscience*, 31, 33,11762-71.

Lu, Y., Christian, K. & Lu, B. (2008). BDNF: A key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory? *Neurobiology of Learning and Memory*, 89, 312-323.

Lynch G, Rex CS, & Gall CM. (2007). LTP consolidation: substrates, explanatory power, and functional significance. *Neuropharmacology*, 52 (1), 12-23.

Lynch, G., Rex, C., S, & Gall, C., M. (2007). LTP consolidation: substrates, explanatory power, and functional significance. *Neuropharmacology*, 52:12–23.

Lynch, M.A., Voss, K.L., Rodriguez, J., & Bliss, T.V. (1994). Increase in synaptic vesicle proteins accompanies long-term potentiation in the dentate gyrus. *Neuroscience*, 60, 1–5.

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

Marr, D. (1971). Simple memory: a theory for archicortex. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Science*, 262, 23–81.

Martínez-Moreno, A., Rodríguez-Durán, L.F. & Escobar, M.L. (2011). Late proteinsynthesis dependent phases in CTA long-term memory: BDNF requirement. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 5 (61), 1–6.

Matias, C. M, Dionisio, J. C, Saggau, P. & Quintana-Ferreira, M. A. (2014). Activation of group II metabotropic glutamate receptors blocks zinc release from hippocampal mossy fibers. *Biological Research*, 47 (1), 73.

Mayford, M., Siegelbaum, S. A. & Kandel, E. R. (2012). Synapses and memory storage. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(6), 1-18.

McGaugh JL. (2000). Memory: a century of consolidation. *Science*, 287, 248–251.

Messaoudi, E., Ying, S-W, Kanhema, T., Croll, S. D. & Bramham, C. R. (2002). Brain-derived neurotrophic factor triggers transcription-dependent, late phase long-term potentiation in vivo. *Journal of Neuroscience*, 22, 7453–7461.

Minichiello, L., Korte, M., Wolfer, D., Kuhn, R., Unsicker, K., Cestari, Neu- V., Rossi-Arnaud, C., Lipp, H.P., Bonhoeffer, T., & Klein, R. (1999). Essential role for TrkB receptors in hippocampus-mediated learning. *Neuron*, 24, 401–414.

Moguel-González, M., Gómez-Palacio-Schjetnan, A. & Escobar, M. L. (2008). BDNF reverses the CTA memory deficits produced by inhibition of protein synthesis. *Neurobiology of Learning and Memory*, 90, 584–587.

Morimoto, K., Sato, K., Sato, S., Yamada, N., & Hayabara, T. (1998). Time-dependent changes in rat hippocampal synapsin I mRNA expression during long-term potentiation. *Brain Research*, 783, 57–62.

Morris RG (2006) Elements of a neurobiological theory of hippocampal function: the role of synaptic plasticity, synaptic tagging and schemas. *European Journal of Neuroscience*, 23, 2829–2846.

Nakazawa, K. (2002). Requirement for hippocampal CA3 NMDA receptors in associative memory recall. *Science* 297, 211–218.

Nicoll, R. A. & Schmitz, D. (2005). Synaptic plasticity at hippocampal mossy fiber synapses. *Nature Reviews of Neuroscience*, 6, 863–876.

Ouyang, Y., Rosenstein, A., Kreiman, G., Schuman, E. M., & Kennedy M. B. (1999). Tetanic stimulation leads to increased accumulation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II via dendritic protein synthesis in hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience*, 19, 7823–7833.

Pang PT, Teng HK, Zaitsev E, Woo NT, Sakata K, Zhen S, Teng KK, Yung WH, Hempstead BL, & Lu B. (2004). Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science*, 306, 487–491.

Patterson SL, Grover LM, Schwartzkroin PA, & Bothwell M. (1992). Neurotrophin expression in rat hippocampal slices: a stimulus paradigm inducing LTP in CA1 evokes increases in BDNF and NT-3 mRNAs. *Neuron*, 9, 1081–1088.

Patterson SL, Pittenger C, Morozov A, Martin KC, Scanlin H, Drake C, & Kandel ER. (2001). Some forms of cAMP-mediated long-lasting potentiation are associated with release of BDNF and nuclear translocation of phospho-MAP kinase. *Neuron*, 32, 123–140.

Patterson SL, Abel T, Deuel TA, Martin KC, Rose JC & Kandel ER. (1996). Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron*, 16(6), 1137-45.

Paxinos, G. & Watson, C. (2007). The rat brain in stereotaxic coordinates (Amsterdam; Boston: Elsevier).

Prado-Alcalá R. A., Medina A. C., Bello-Medina P. C. & Quirarte G. L. (2017). Inhibition of transcription and translation in the striatum after memory reactivation: Lack of evidence of reconsolidation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 142, 21–29.

Ramírez-Amaya, V., Balderas, I., Sandoval, J., Escobar, M. L. & Bermúdez-Rattoni, F. (2001). Spatial long-term memory is related to mossy fiber synaptogenesis. *Journal of Neuroscience*, 21, 7340–7348

Ramos-Languren, L. E. & Escobar, M. L. (2013). Plasticity and metaplasticity of adult rat hippocampal mossy fibers induced by neurotrophin-3. *European Journal of Neuroscience*, 37, 1248–1259.

Reichardt, L. F. (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, 361(1473):1545-64.

Rekart, J.L, Sandoval, C.J, Bermudez-Rattoni, F. & Routtenberg, A. (2007). Remodeling of hippocampal mossy fibers is selectively induced seven days after the acquisition of a spatial but not a cued reference memory task. *Learning and Memory*, 14(6), 416-21.

Saha, R. N., Wissink, E.M., Bailey, E. R., Zhao, M., Fargo, D.C., Hwang, J.-Y., et al. (2011). Rapid activity-induced transcription of Arc and other IEGs relies on poised RNA polymerase II. *Nature Neuroscience*, 14, 848–856.

Scharfman HE, Goodman JH, Sollas AL, Croll SD. (2002). Spontaneous limbic seizures after intrahippocampal infusion of brain-derived neurotrophic factor. *Experimental Neurology*, 174(2), 201-14.

Schjetnan, A. G-P & Escobar, M. L. (2012). In vivo BDNF modulation of hippocampal mossy fiber plasticity induced by high frequency stimulation. *Hippocampus*, 22, 1–8.

Tanaka, J., Horiike, Y., Matsuzaki, M., Miyazaki, T., Ellis-Davies, G. C. y Kasai, H. (2008). Protein synthesis and neurotrophin-dependent structural plasticity of single dendritic spines. *Science* 319, 1683–1687.

Terman, G. W., Drake, C. T., Simmons, M. L., Milner, T. A., & Chavkin, C. (2000). Opioid modulation of recurrent excitation in the hippocampal dentate gyrus. *Journal of Neuroscience*, 20(12), 4379-88.

Thomas MG, Pascual ML, Maschi D, Luchelli L, Boccaccio GL. (2014). Synaptic control of local translation: the plot thickens with new characters. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(12), 2219-39.

Wagatsuma A, Okuyama T, Sun C, Smith LM, Abe K, Tonegawa S. (2018). Locus coeruleus input to hippocampal CA3 drives single-trial learning of a novel context. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(2), E310-E316.

Xu, B., Gottschalk, W., Chow, A., Wilson, R., Schnell, E., Zang, K., Wang, D., Nicoll, R., Lu, B., & Reichardt, L. (2000). The role of brain derived neurotrophic factor receptors in the mature hippocampus: modulation of long-term potentiation through a presynaptic mechanism involving TrkB. *Journal of Neuroscience*, 20, 6888–6897.

Yan Q, Rosenfeld RD, Matheson CR, Hawkins N, Lopez OT, Bennett L, & Welcher AA. (1997). Expression of brain-derived neurotrophic factor protein in the adult rat central nervous system. *Neuroscience*, 78:431–448.

Figure captions

Fig. 1. A) Schematic representation and representative images of electrodes placement showing the stimulated (S) and recording sites in a coronal plane. Scale bar: 0.5mm, DG: Dentate Gyrus. **B)** Representative traces of the EPSP obtained at baseline (full line) and after DCG-IV administration (dotted line). Note that DCG-IV blocked MF responses. Scale bar: 5ms, 0.25 mV. **C)** Schematic representation of the experimental procedure. HFS: high frequency stimulation, LTP: long-term potentiation.

Fig. 2. BDNF induces LTP and synaptic reorganization at MF pathway under transcription and translation proteins inhibition conditions. A) Plot of mossy fiber evoked responses from groups BDNF, PBS, DRB+BDNF, DRB+PBS, ANI+BDNF and ANI+PBS. Note that after BDNF infusion, EPSP slope values were significantly

elevated above baseline, despite of the previous administration of drugs DRB and ANI, which interfere with transcription and translation process, respectively. The top of each graph shows average of MF field potentials obtained immediately before (dotted line, number 1), and at the end of the register (full line, number 2). Bars indicate the infusion period, 5 min for DRB or ANI and 10 min for BDNF and PBS. Scale bar: 5 ms and 0.25 mV. **B)** Coronal sections of dorsal hippocampus from intact control (CONTROL, **a** and **b**), BDNF (**c** and **d**), PBS (**e** and **f**), DRB+BDNF (**g** and **h**), DRB+PBS (**i** and **j**), ANI+BDNF (**k** and **l**), and ANI+PBS (**m** and **n**) groups, showing the distribution of Timm-stained mossy fibers buttons at the stratum lucidum (SL) and at the stratum oriens/pyramidale (SOSP). Note that BDNF produces synaptic reorganization pattern (arrows) despite of mRNA synthesis and protein *de novo* inhibition; scale bar: 0.5mm. **C)** Densitometric analysis of BDNF effects on synaptic reorganization of hippocampal mossy fibers. Graphic shows the relative area (SOSP/SL) of Timm's staining of the dorsal hippocampus for all groups. *** $p < 0.0001$

Fig. 3. HFS-LTP and synaptic reorganization at MF pathway require of mRNA synthesis and protein synthesis *de novo*. **A)** Plot of mossy fiber evoked responses from groups HFS, DRB+HFS, and ANI+HFS. Note that HFS application induces and maintains LTP that is affected or blocked under transcription or translation inhibition conditions. The top of each graph shows average of MF field potentials obtained immediately before (dotted line, number 1), 60 min after HFS (only for the medium panel, number 2), and at the end of the register (full line, number 2 and number 3 only for the medium panel). Arrows indicate HFS delivery. Bars indicate the infusion

period, 5 min. Scale bar: 5 ms and 0.25 mV. **B)** Coronal sections of dorsal hippocampus from intact control (CONTROL, a and b), HFS (c and d), DRB+HFS (e and f), and ANI+HFS (g and h) groups, showing the distribution of Timm-stained mossy fibers buttons at the stratum lucidum (SL) and at the stratum oriens/piramidale (SOSP). Note that HFS produces synaptic reorganization pattern (arrows) that was blocked in DRB+HFS and ANI+HFS groups; scale bar: 0.5mm. **C)** Densitometric analysis of transcription and translation inhibition effects on synaptic reorganization of hippocampal mossy fibers. Graphic shows the relative area (SOSP/SL) of Timm's staining of the dorsal hippocampus for all groups. *** $p < 0.0001$

Figure 1

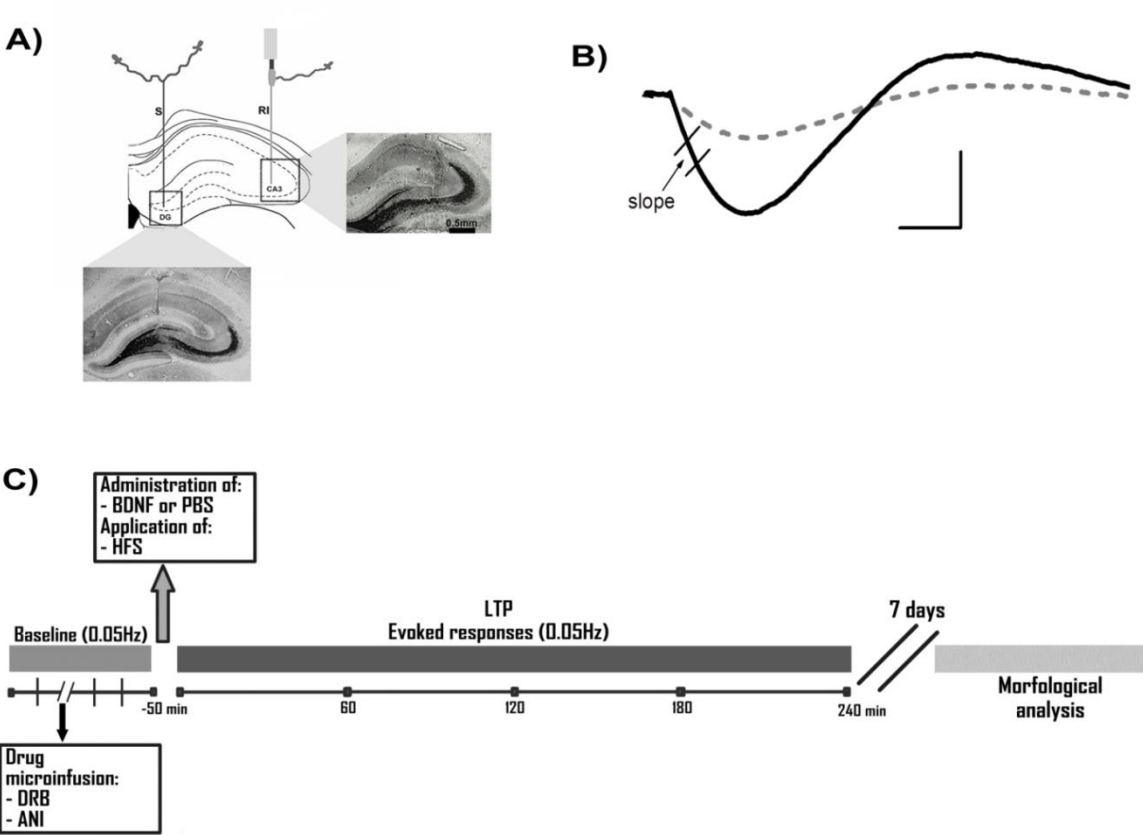


Figure 2

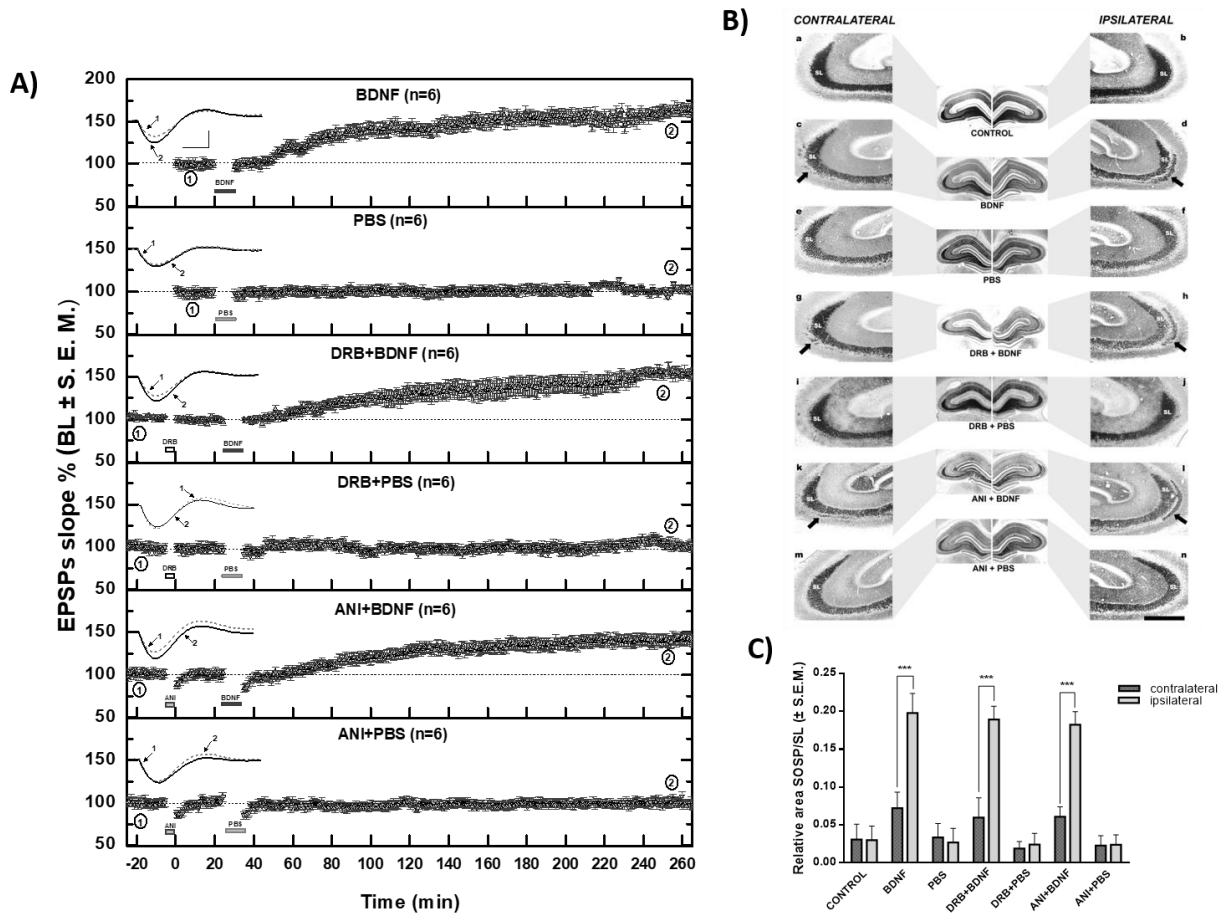
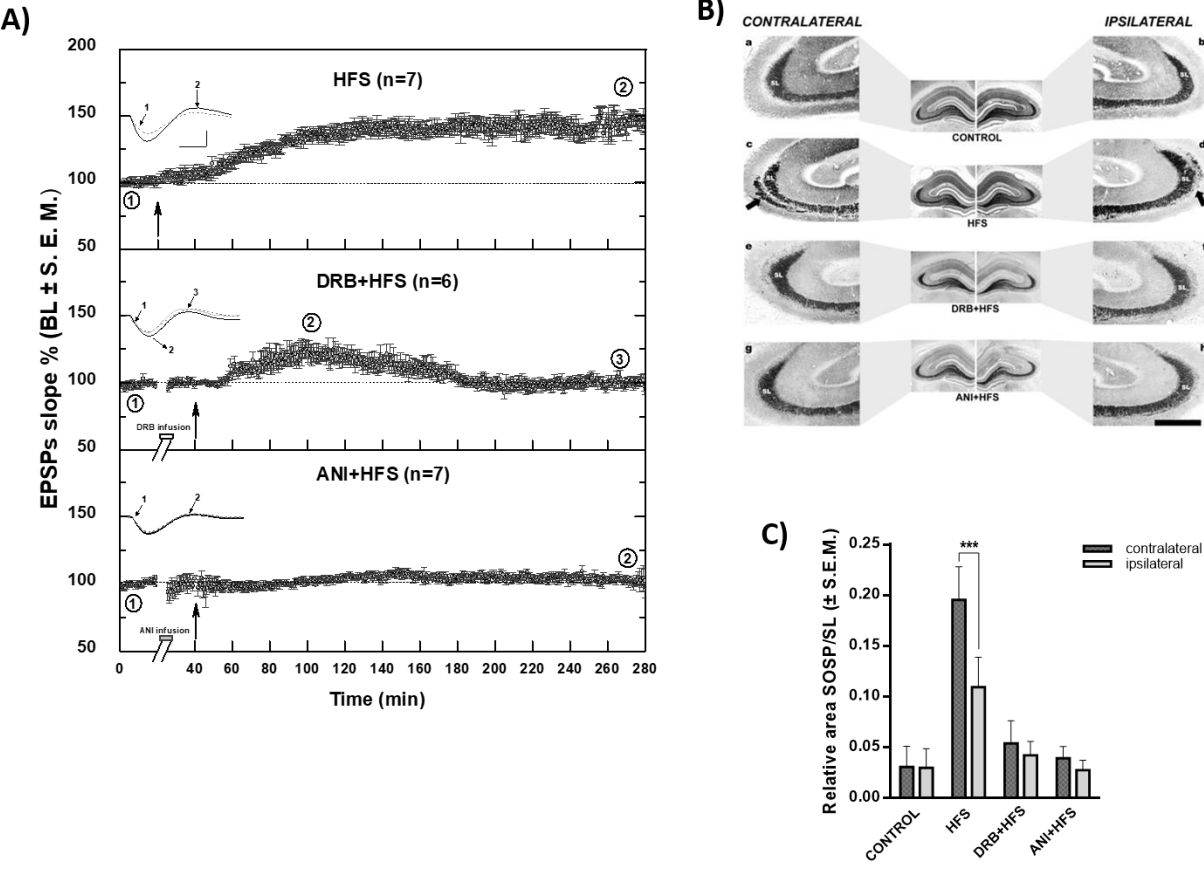


Figure 3



13. ANEXO 3

El anexo 3 corresponde al artículo de investigación derivado de una investigación en la que participé durante mis estudios de doctorado, en el que se reportan los resultados correspondientes a la modulación bidireccional de la aversión al sabor inducida por LTP y LTD en la corteza insular.

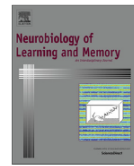
Referencia:

Rodríguez-Durán, L. F., Martínez-Moreno, A., Escobar, M. L. (2017). Bidirectional modulation of taste aversion extinction by insular cortex LTP and LTD. *Neurobiol Learn Mem.*, 142, 85-90. doi: 10.1016/j.nlm.2016.12.014.



Contents lists available at ScienceDirect

Neurobiology of Learning and Memory

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ynlme

Bidirectional modulation of taste aversion extinction by insular cortex LTP and LTD



Luis F. Rodríguez-Durán, Araceli Martínez-Moreno, Martha L. Escobar*

División de Investigación y Estudios de Posgrado, Facultad de Psicología, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 October 2016

Revised 16 December 2016

Accepted 23 December 2016

Available online 27 December 2016

Keywords:

Conditioned taste aversion

Memory extinction

Metaplasticity

LTD

Insular cortex

ABSTRACT

The history of activity of a given neuron has been proposed to bidirectionally influence its future response to synaptic inputs. In particular, induction of synaptic plasticity expressions such as long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD) modifies the performance of several behavioral tasks. Our previous studies in the insular cortex (IC), a neocortical region that has been related to acquisition and retention of conditioned taste aversion (CTA), have demonstrated that induction of LTP in the basolateral amygdaloid nucleus (Bla)-IC pathway before CTA training enhances the retention of this task. In addition, we reported that CTA training triggers a persistent impairment in the ability to induce *in vivo* LTP in the IC. The aim of the present study was to investigate whether LTD can be induced in the Bla-IC projection *in vivo*, as well as, whether the extinction of CTA is bidirectionally modified by previous synaptic plasticity induction in this pathway. Thus, rats received 900 train pulses (five 250 μ s pulses at 250 Hz) delivered at 1 Hz in the Bla-IC projection in order to induce LTD or 10 trains of 100 Hz/1 s with an intertrain interval of 20 s in order to induce LTP. Seven days after surgery, rats were trained in the CTA task including the extinction trials. Our results show that the Bla-IC pathway is able to express *in vivo* LTD in an N-Methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-dependent manner. Induction of LTD in the Bla-IC projection previous to CTA training facilitates the extinction of this task. Conversely, LTP induction enhances CTA retention. The present results show the bidirectional modulation of CTA extinction in response to IC-LTP and LTD, providing evidence of the homeostatic adaptation of taste learning.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Learning and memory are associated with activity-dependent modifications of synaptic strength guided by specific patterns of neuronal activity (Citri & Malenka, 2008; Viturera & Goda, 2013). The so called activity-dependent plasticity can occur as Hebbian expressions that progressively modify network properties, as well as, homeostatic expressions that promote network stability (Turrigiano & Nelson, 2000). Hebbian plasticity as long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD) are regulated in a homeostatic manner (Turrigiano, 2012; Viturera & Goda, 2013). In this regard, metaplasticity refers to the homeostatic modification in the ability to induce synaptic plasticity, by previous activity (Müller-Dahlhaus & Ziemann, 2015). Early studies on metaplasticity were conducted in the synaptic and cellular level, but the term is now considered very useful to describe plasticity changes on a more global level, including altered behavior as an outcome

measure (Hulme, Jones, & Abraham, 2013; Smith, Heynen, & Bear, 2009). Behavioral metaplasticity is proposed to alter learning and memory, considering that a priming event may determine the nature, time course and character of the subsequent behavioral expression (Abraham, 2008; Hulme et al., 2013; Schmidt, Abraham, Maroun, Stork, & Richter-Levin, 2013), but the mechanisms underlying this phenomenon are not well understood.

Studies in the neocortex and hippocampus have demonstrated that sensory use, disuse and training in several learning tasks drive bidirectional modifications of synaptic strength, i.e. LTP or LTD (Cooke & Bear, 2010; D'Alcantara, Schiffmann, & Swillens, 2003; Feldman, 2009; Huerta & Lisman, 1995; Nabavi et al., 2014; Quinlan, Lebel, Brosh, & Barkai, 2004; Rioult-Pedotti, Friedman, & Donoghue, 2000). Whereas it is widely accepted that long-term memory storage requires LTP-like mechanisms in the hippocampus and neocortex (McKernan & Shinnick-Gallagher, 1997; Rioult-Pedotti, Friedman, Hess, & Donoghue, 1998; Rogan, Staubli, & LeDoux, 1997; Whitlock, Heynen, Shuler, & Bear, 2006), the role of LTD in learning and memory has been less explored (Malleret et al., 2010). Even so, LTP and LTD in the amygdala are produced during the formation and removal of memory, respectively (Nabavi et al., 2014), and memory loss due to brain diseases

* Corresponding author at: División de Investigación y Estudios de Posgrado, Facultad de Psicología, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 CDMX México, Mexico.

E-mail address: mescobar@unam.mx (M.L. Escobar).

is associated with the enhancement of LTD or impairment of LTP (Bliss & Cooke, 2011). These studies are consistent with the idea that LTP and LTD are the actual synaptic processes underlying memory at several brain areas, including neocortex.

The insular cortex (IC) is a region of the temporal neocortex implicated in the acquisition, storage and extinction of conditioned taste aversion (CTA) memory (Bermúdez-Rattoni, Nunez-Jaramillo, & Balderas, 2005). CTA is a well-established learning and memory paradigm in which an animal associates a novel taste with a noxious stimulus (Bermúdez-Rattoni, 2004, 2014). After the establishment of an association between the two stimuli, the conditioned response will decrease if the taste is presented in the absence of the noxious stimulus and this phenomenon is called extinction (Bermúdez-Rattoni, 2004). A previous study from our group showed that basolateral amygdaloid nucleus (Bla) stimulation induces LTP in the IC (Escobar, Chao, & Bermúdez-Rattoni, 1998). Moreover, in recent studies we showed that CTA training modifies the ability to induce subsequent Bla-IC LTP generated either by brain-derived neurotrophic factor (BDNF; Rivera-Olvera, Rodríguez-Durán, & Escobar, 2016) or by high frequency stimulation (HFS) in a protein synthesis and protein kinase C activation-dependent manner (Rodríguez-Durán, Castillo, Moguel-Gonzalez, Escobar, 2011; Rodríguez-Durán & Escobar, 2014). We also demonstrated that LTP in the Bla-IC projection previous to CTA training increases the memory retention of this task (Escobar & Bermúdez-Rattoni, 2000), showing that the extinction process is altered after an increase in synaptic efficacy of the mentioned pathway. However, it remains unknown if it is possible to induce LTD in the Bla-IC projection and if this decrease in synaptic efficacy could modulate CTA extinction. In the present study we explored whether *in vivo* LTD can be induced in the Bla-IC projection and if LTP and LTD on this pathway differentially affects CTA training and extinction.

2. Methods

2.1. Animals

Forty male Wistar rats, weighing 360–390 g, were prepared 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* unless noted otherwise. Experiments were performed in accordance with the Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) and the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals with the approval of the local animal care committee.

2.2. CTA

Animals were placed on a water deprivation schedule, allowing access to water twice a day from a graduated cylinder, during 10 min trials for 3 days. On the conditioning day saccharin solution 0.1% (Sigma, St. Louis, MO) was available instead of water, and 10 min later, rats were injected with LiCl (0.15 M; 7.5 ml/kg). To test the aversion 0.1% saccharin solution was presented again after three more days of baseline consumption. The reduction of saccharin consumption was used as a measure of the strength of aversion. The extinction phase consisted of nine trials (one every other day over the course of 18 days).

2.3. *In vivo* electrophysiological recordings

Rats were anesthetized with pentobarbital (50 mg/kg *i.p.*), and given supplemental injections (10 mg/kg) at 1-h intervals. Body temperature was maintained at 35 °C with a heating pad. Responses were recorded by using a monopolar microinfusion electrode placed in the IC at the stereotaxic coordinates: AP +

1.2 mm, ML 5.5 mm, DV 5.5 mm \pm 0.2 (Paxinos & Watson, 2013). 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 (0.005-in. diameter) at the stereotaxic coordinates: AP 2.8 mm, ML 5.0 mm, DV 8.5 mm \pm 0.2 (Paxinos et al., 2013) (Fig. 1A). Animals with unclear electrode placement were discarded. Microinfusion electrodes consisted of 33-gauge stainless steel epoxyite-covered cannulae coupled to polyethylene tubing through a 26-gauge stainless steel ring, connected to a Teflon coated stainless steel wire (0.005-in. diameter). Polyethylene tubing was attached to a 10- μ l Hamilton syringe (Reno, NV, USA) that was driven by a microinfusion pump (Cole Parmer Co., Vernon Hills, IL, USA). Evoked responses from IC were measured by obtaining the field excitatory postsynaptic potential (EPSP) slope. 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. LTD was induced by 900 stimulus trains (five 250 μ s pulses at 250 Hz) delivered at 1 Hz. LTP or LTD were calculated as a percentage of change with respect to the mean slope of field potentials before conditioning stimulation.

2.4. Experimental design

In order to characterize LTD induction in the IC, animals were divided into the following groups: (1) LTD group ($n = 7$), which underwent surgery, had electrodes implanted and received 900 stimulus trains (five 250 μ s pulses at 250 Hz) delivered at 1 Hz in order to induce LTD; (2) LTD + CPP group ($n = 6$), that received the same treatment as the LTD group and the competitive NMDA receptor antagonist 3-(2-carboxypiperazin-4-yl) propyl-1-phosphonic acid (CPP; 0.05 μ g/0.5 μ l per hemisphere; 0.1 μ l/min; Tocris, Ellisville, MO, USA; Rodríguez-Durán & Escobar, 2014), 20 min before the LTD stimulation protocol; (3) LTD + VEH group ($n = 5$), which received the same treatment as the LTD group and PBS as vehicle (0.5 μ l per hemisphere; 0.1 μ l/min) 20 min before the LTD stimulation protocol.

To examine the effect of bidirectional synaptic plasticity on the extinction of CTA, animals were divided into the following groups: (1) LTD + CTA group ($n = 7$), which underwent electrode implantation and received 900 stimulus trains (five 250 μ s pulses at 250 Hz) delivered at 1 Hz in order to induce LTD; (2) LTP + CTA group ($n = 7$), which underwent electrode implantation and received high frequency stimulation (10 trains/100 Hz, 20 s intertrain; Escobar et al., 1998; Rodríguez-Durán et al., 2011) in order to induce LTP; (3) SHAM + CTA group ($n = 8$), which underwent electrode implantation and received just the basal stimulation (0.05 Hz) during the entire recording (Fig. 2A). Seven days after surgery animals from all groups were trained in the CTA task.

3. Results

3.1. Induction of LTD in the Bla-IC projection is NMDA receptor-dependent

Histological examinations revealed that stimulating and recording electrodes were correctly located in the Bla and IC respectively for all groups (Fig. 1A). Animals with unclear electrode placement were discarded.

The IC field EPSP consisted of 0.34 \pm 0.04 mV (mean \pm S.E.M.) potentials elicited with 60–90 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 0.098 \pm 0.002. (mean \pm S.E.M.), in agreement with

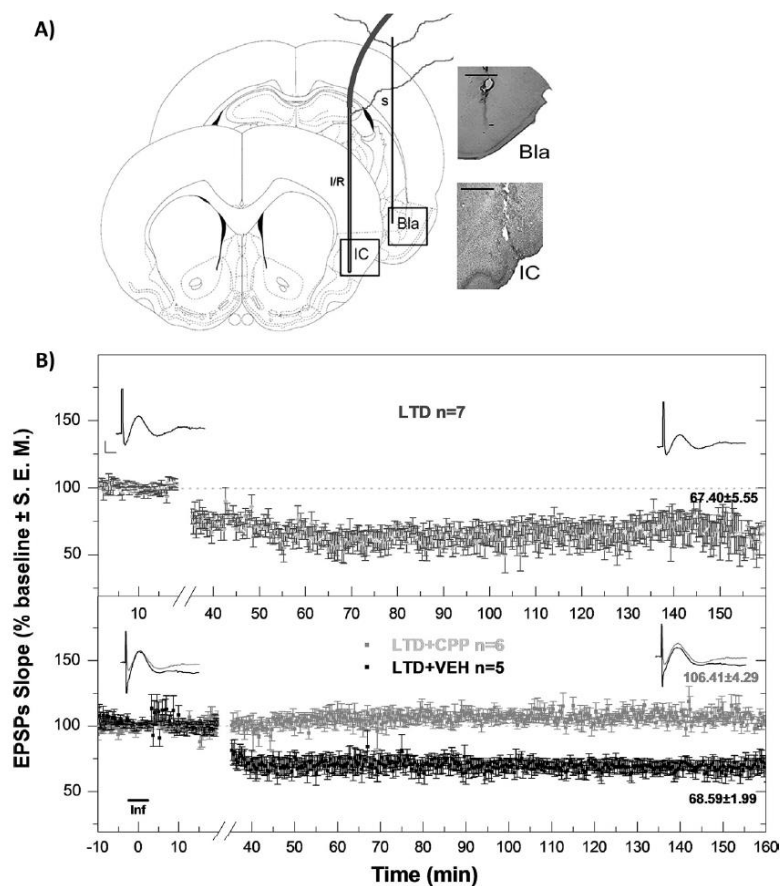


Fig. 1. LTD-induction of the Bla-IC pathway in vivo. (A) Schematic representation and representative images of electrode placement showing the stimulated (S) and recorded (I/R) sites in a coronal plane. Scale bar: 1 mm. (B) Plot of insular cortex evoked responses from LTD (upper panel), LTD + CPP and LTD + VEH (lower panel) groups, showing that IC-LTD is NMDA receptor-dependent. The top of each graph shows average of IC field potentials obtained immediately before and 110 min after the conditioned stimulation. The inner numbers show the average EPSPs slope (percent of baseline) from the last 20 m of record (i.e. from minute 140–160). Bar indicates the infusion period (5 min). Bla: basolateral amygdaloid nucleus; IC: insular cortex. Scale bar: 5 ms, 0.2 mV.

previous studies (Rivera-Olvera et al., 2016; Rodríguez-Durán et al., 2011).

Delivery of 900 stimulus trains (five 250 μ s pulses at 250 Hz) at 1 Hz in the Bla, successfully induced LTD in the IC. The IC field EPSPs showed a decrease (amplitude 0.23 ± 0.07 ; slope 0.066 ± 0.009) (mean \pm S.E.M.), immediately after and during a period of at least 2 h after conditioning stimulation (Fig. 1B, upper panel).

As shown in Fig. 1B (lower panel), in vivo LTD was blocked by administration of the NMDA receptor antagonist CPP, compared with vehicle and LTD groups. Repeated-measures ANOVA analysis for after-tetanus slope EPSPs revealed significant group differences ($F_{2,15} = 14.09$; $p < 0.01$), suggesting that IC-LTD induction is dependent on NMDA receptors. Post-hoc analysis with Fisher's test showed significant differences between the LTD + CPP group and the other two groups ($p < 0.01$).

3.2. Bidirectional modulation of taste aversion extinction by LTD and LTP

The present results show that the Bla-IC projection exhibits in vivo bidirectional synaptic plasticity (Fig. 2B). Repeated-measures ANOVA analysis for after-tetanus slope EPSPs revealed significant group differences ($F_{2,19} = 12.48$; $p < 0.01$) for the

LTP + CTA, LTD + CTA and SHAM + CTA groups. Post-hoc analysis with Fisher's test showed significant differences among the three groups ($p < 0.01$).

No significant differences among groups were found either in the baseline water intake or during the CTA acquisition session. As shown in Fig. 2C, LTD induction in the IC seven days before CTA training facilitated extinction, whereas LTP enhanced CTA retention. Two-way ANOVA with repeated measures on the CTA extinction sessions revealed significant differences among groups ($F_{2,19} = 9.51$, $p < 0.001$). Post-hoc analysis with Fisher's test showed specific differences during the second, third and fourth extinction trials between the LTD + CTA and SHAM + CTA groups ($p < 0.05$), while the LTP + CTA group presented differences with respect to SHAM + CTA group from the second to the eighth extinction session ($p < 0.05$). On the first extinction trial, no differences among groups were found, indicating that they all showed a maximum aversion and therefore a plateau effect. These results reveal that LTP and LTD in the IC modulate bidirectionally the extinction processes.

4. Discussion

Synapse strength may exhibit bidirectional modifications, i.e. either LTP or LTD, which are activity-dependent forms of synaptic

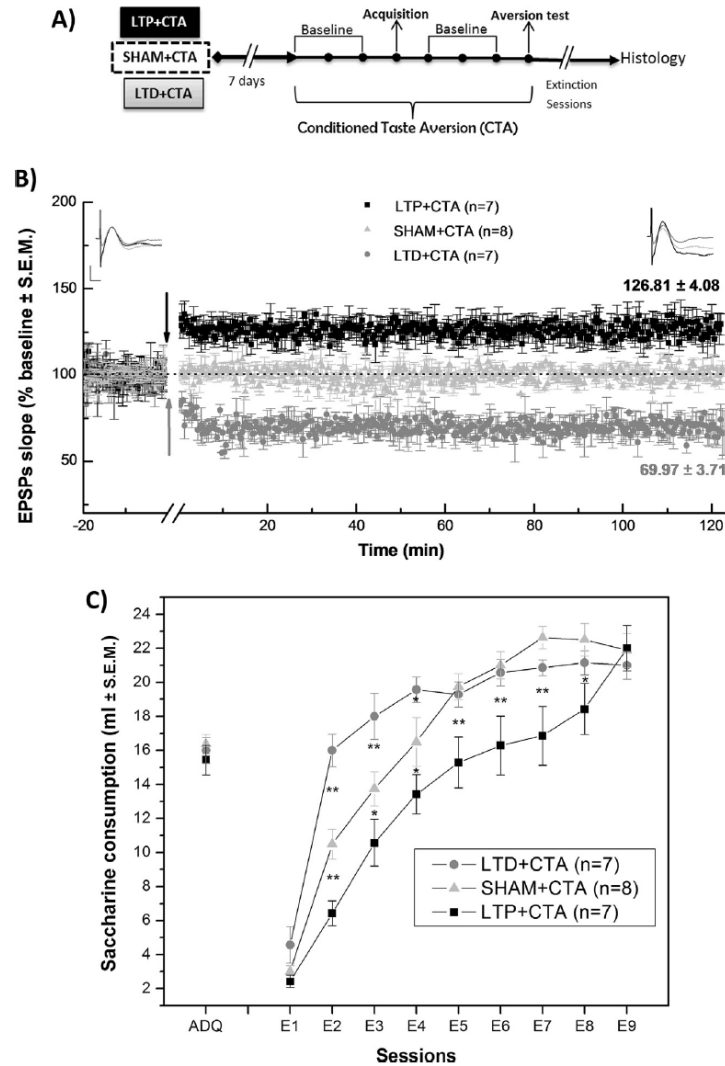


Fig. 2. Bidirectional modulation of CTA extinction by IC-LTP and LTD. (A) Diagram of the experimental procedure. (B) Plot of insular cortex evoked responses from LTP + CTA, SHAM + CTA and LTD + CTA groups. The top of each graph shows average of IC field potentials obtained immediately before and 110 min after the conditioned stimulation. The inner numbers show the average EPSPs slope (percent of baseline) from the last 20 m of record (i.e. from minute 110–120). Black and gray arrows indicate delivery stimulation to induce LTP or LTD respectively. Scale bar: 5 ms, 0.2 mV. (C) Point-plot of the acquisition session (ACQ) and nine extinction trials (E1–E9) given to LTD + CTA, SHAM + CTA and LTP + CTA groups, showing that LTD facilitates CTA extinction while LTP enhances CTA retention. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

plasticity thought to underlie memory formation (D'Alcantara et al., 2003; Stragier et al., 2015). However, the specific role of bidirectional plasticity to modulate memory is not well understood. The results of the present study show that LTP and LTD induction in the Bla-IC projection bidirectionally modulate the extinction of conditioned taste aversion.

In a previous study we showed that Bla stimulation induces LTP in the IC (Escobar et al., 1998). In addition, recent studies from our group demonstrate that CTA training modifies the ability to induce subsequent Bla-IC-LTP generated by either brain-derived neurotrophin factor administration or high frequency stimulation, in a protein synthesis, as well as, protein kinase C activation dependent manner (Rivera-Olvera et al., 2016; Rodríguez-Durán & Escobar, 2014). Interestingly, induction of LTP in the Bla-IC projec-

tion prior to training in the CTA task increased CTA-memory retention (Escobar & Bermúdez-Rattoni, 2000). The results of the present study show that Bla-IC pathway is able to express in vivo LTD in a NMDA receptor-dependent manner. Our results show that 900 stimulus trains (five 250 μ s pulses at 250 Hz) delivered at 1 Hz (Takita, Izaki, Jay, Kaneko, & Suzuki, 1999) were necessary to induce in vivo LTD in the Bla-IC projection. NMDA receptor has long been considered to be closely linked with long-term synaptic plasticity, because of its properties of high Ca^{2+} permeability and voltage-dependent activity (Bliss & Collingridge, 1993; Huang, Yang, Huang, Sun, & Sun, 2016). As reviewed by He et al., LTD is induced by transient Ca^{2+} and requires the activation of NMDA receptors, which initiates a Ca^{2+} influx to trigger a postsynaptic cascade that decreases synaptic efficacy (He, Kulasiri, &

- Li, W.-G., Liu, M.-G., Deng, S., Liu, Y.-M., Shang, L., Ding, J., ... Jordan, B. A. (2016). ASIC1a regulates insular long-term depression and is required for the extinction of conditioned taste aversion. *Nature Communications*, 7, 13770.
- Malleret, G., Alarcon, J. M., Martel, G., Takizawa, S., Vronskaya, S., Yin, D., ... Shumyatsky, G. P. (2010). Bidirectional regulation of hippocampal long-term synaptic plasticity and its influence on opposing forms of memory. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(10), 3813–3825.
- Manahan-Vaughan, D., & Braunewell, K. H. (1999). Novelty acquisition is associated with induction of hippocampal long-term depression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(15), 8739–8744.
- 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.
- 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.
- McKenzie, S., & Eichenbaum, H. (2011). Consolidation and reconsolidation: Two lives of memories? *Neuron*, 71(2), 224–233.
- McKernan, M. G., & Shinnick-Gallagher, P. (1997). Fear conditioning induces a lasting potentiation of synaptic currents in vitro. *Nature*, 390(6660), 607–611.
- Müller-Dahlhaus, F., & Ziemann, U. (2015). Metaplasticity in human cortex. *Neuroscientist*, 21(2), 185–202.
- 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(7509), 348–352.
- Nader, K., Schafe, G. E., & Le Doux, J. E. (2000). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*, 406(6797), 722–726.
- Paxinos, G. y., & Watson, C. (2013). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (7th ed.). Boston: Elsevier.
- Pozo, K., & Goda, Y. (2010). Unraveling mechanisms of homeostatic synaptic plasticity. *Neuron*, 66(3), 337–351.
- Quinlan, E. M., Lebel, D., Brosh, I., & Barkai, E. (2004). A molecular mechanism for stabilization of learning-induced synaptic modifications. *Neuron*, 41(2), 185–192.
- Rescorla, R. A. (2001). Retraining of extinguished Pavlovian stimuli. *Journal of Experimental Psychology. Animal Behavior Processes*, 27(2), 115–124.
- Rioult-Pedotti, M. S., Friedman, D., & Donoghue, J. P. (2000). Learning-induced LTP in neocortex. *Science*, 290(5491), 533–536.
- Rioult-Pedotti, M. S., Friedman, D., Hess, G., & Donoghue, J. P. (1998). Strengthening of horizontal cortical connections following skill learning. *Nature Neuroscience*, 1(3), 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.
- Rodríguez-Durán, L. F., Castillo, D. V., Moguel-Gonzalez, M., & Escobar, M. L. (2011). Conditioned taste aversion modifies persistently the subsequent induction of neocortical long-term potentiation in vivo. *Neurobiology of Learning and Memory*, 95(4), 519–526.
- 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-Ortiz, C. J., Balderas, I., García-DeLaTorre, P., & Bermudez-Rattoni, F. (2012). Taste aversion memory reconsolidation is independent of its retrieval. *Neurobiology of Learning and Memory*, 98(3), 215–219.
- 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., Staubli, U. V., & LeDoux, J. E. (1997). Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature*, 390(6660), 604–607.
- 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.
- 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*, 364(1515), 357–367.
- Stragier, E., Martin, V., Davenas, E., Poilbout, C., Mongeau, R., Corradetti, R., & Lanfumey, L. (2015). Brain plasticity and cognitive functions after ethanol consumption in C57BL/6j mice. *Translational Psychiatry*, 5(12), e696.
- Suárez, L. D., Smal, L., & Delorenzi, A. (2010). Updating contextual information during consolidation as result of a new memory trace. *Neurobiology of Learning and Memory*, 93(4), 561–571.
- Takita, M., Izaki, Y., Jay, T. M., Kaneko, H., & Suzuki, S. S. (1999). Induction of stable long-term depression in vivo in the hippocampal-prefrontal cortex pathway. *The European Journal of Neuroscience*, 11(11), 4145–4148.
- Turrigiano, G. (2012). Homeostatic synaptic plasticity: Local and global mechanisms for stabilizing neuronal function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(1), a005736.
- Turrigiano, G., & Nelson, S. B. (2000). Hebb and homeostasis in neuronal plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*, 10(3), 358–364.
- Viturreira, 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.
- Whitlock, J. R., Heynen, A. J., Shuler, M. G., & Bear, M. F. (2006). Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science*, 313(5790), 1093–1097.
- 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.
- Zhang, M., Storm, D. R., & Wang, H. (2011). Bidirectional synaptic plasticity and spatial memory flexibility require Ca²⁺-stimulated adenylyl cyclases. *Journal of Neuroscience*, 31(28), 10174–10183.

