



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN PSICOLOGÍA

**EFFECTO DE LA EXPOSICIÓN A UN AMBIENTE ENRIQUECIDO SOBRE LA FORTALEZA DE UNA
MEMORIA AVERSIVA Y LA PLASTICIDAD SINÁPTICA NEOCORTICAL: REGULACIÓN HOMEOSTÁTICA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN PSICOLOGÍA

PRESENTA

BEATRIZ GUTIÉRREZ VERA

TUTORA:

DRA. MARTHA L. ESCOBAR RODRÍGUEZ

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

COMITÉ

DRA. LIVIA SÁNCHEZ CARRASCO

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

DR. ROBERTO AGUSTIN PRADO ALCALÁ

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

DRA. GINA LORENA QUIRARTE

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

DRA. IRMA YOLANDA DEL RÍO PORTILLA

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., marzo 2024



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.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 5 |
| ABSTRACT | 6 |
| GLOSARIO DE ABREVIATURAS | 7 |
| INTRODUCCIÓN | 8 |
| Ambientes enriquecidos | 9 |
| El enriquecimiento ambiental como modulador de los estímulos aversivos | 11 |
| Modulación de respuestas aversivas y modificación de la señalización neuroquímica generada por el enriquecimiento ambiental: participación del BDNF | 12 |
| El condicionamiento de aversión al sabor | 15 |
| El sustrato neuroanatómico del CAS | 17 |
| El CAS y las respuestas estresantes | 19 |
| Plasticidad sináptica | 20 |
| Hipótesis de etiquetado y captura sináptica | 21 |
| Plasticidad homeostática | 23 |
| Ambientes enriquecidos y plasticidad sináptica | 27 |
| PLANTEAMIENTO | 28 |
| HIPÓTESIS | 29 |
| OBJETIVOS | 29 |
| MÉTODO | 30 |
| Animales | 30 |
| Entrenamiento en el CAS | 30 |
| Ambiente enriquecido | 31 |
| Registro electrofisiológico <i>in vivo</i> | 31 |

| | |
|---|-----------|
| Curvas entrada-salida (I/O) | 32 |
| Tinción de Nissl | 32 |
| Western Blot | 32 |
| Análisis de datos | 33 |
| Fases experimentales | 33 |
| Fase I | 33 |
| Fase II | 35 |
| Fase III | 37 |
| RESULTADOS | 39 |
| <i>Fase experimental I</i> | 39 |
| La exposición a un ambiente enriquecido durante 21 días atenúa la memoria de aversión del CAS | 39 |
| La interacción AE-CAS restaura los niveles de BDNF en la CI | 40 |
| <i>Fase experimental II</i> | 42 |
| La exposición a AE durante 7 días reduce la aversión del CAS | 42 |
| La exposición a un AE durante 7 días obstruye el mantenimiento de la LTP <i>in vivo</i> de la vía que va del núcleo basolateral amigdalino a la corteza insular | 43 |
| <i>Fase experimental III</i> | 46 |
| La exposición a un AE efectuada entre la sesión de adquisición y la prueba fortalece la memoria de aversión del CAS | 46 |
| DISCUSIÓN | 48 |
| El AE atenúa la aversión en el CAS | 48 |
| La interacción AE-CAS restaura los niveles de BDNF en la CI | 49 |
| La exposición breve a un AE atenúa la respuesta aversiva del CAS | 51 |
| La exposición breve a un AE bloquea el mantenimiento de la LTP <i>in vivo</i> en la CI | 52 |
| Etiquetado conductual: Fortalecimiento de una respuesta aversiva débil como resultado de una breve exposición a un AE | 55 |
| CONCLUSIONES | 57 |
| REFERENCIAS | 58 |
| ANEXOS | 72 |
| Anexo I. Environmental enrichment attenuates conditioned taste aversion through the restoration of BDNF levels in the insular cortex | 73 |

| | |
|--|----|
| Anexo II. Brief environmental enrichment elicits homeostatic plasticity on the insular cortex in vivo and reduces the strength of conditioned taste aversion | 77 |
| Anexo III. Calcineurin requirement for in vivo insular cortex LTD and CTA-extinction | 84 |

RESUMEN

La exposición prolongada a un ambiente enriquecido (AE) ha demostrado una notable capacidad para modular el impacto fisiológico de los estímulos aversivos, fomentando actitudes adaptativas, de modo que los organismos puedan desarrollar resiliencia frente a situaciones estresantes. Asimismo, se ha descrito que el AE puede actuar como un modulador homeostático natural siendo capaz de regular la plasticidad sináptica como la potenciación de largo plazo (LTP), mejorando así los procesos cognitivos. Estos efectos han sido asociados con niveles elevados de factores tróficos, como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), reconocido como una proteína reguladora de la plasticidad sináptica en el cerebro adulto. Investigaciones previas de nuestro grupo de investigación han demostrado que en la corteza insular (CI), una estructura cerebral del lóbulo temporal implicada en la memoria del condicionamiento de aversión al sabor (CAS), el BDNF tiene la capacidad de revertir el déficit de memoria del CAS provocado por un inhibidor de síntesis de proteínas. En este contexto, el modelo conocido como etiquetado conductual constituye un marco de referencia que explica cómo eventos destacados o novedosos son capaces de fortalecer trazos de memoria débiles codificados en ventanas temporales críticas antes o después de la experiencia novedosa. Sin embargo, en la actualidad aún no está claramente delimitada la ventana temporal óptima para llevar a cabo la intervención con un AE para desplegar su capacidad de modulación tanto de la prominencia de los estímulos como de la expresión de plasticidad sináptica. El presente estudio tiene como objetivo evaluar los efectos de la exposición a un ambiente enriquecido sobre la fortaleza de una memoria aversiva, así como sobre la eficiencia de la comunicación sináptica, empleando para ello la tarea denominada CAS, así como el fenómeno de LTP *in vivo* en la vía que va de la amígdala basolateral a la corteza insular de ratas adultas. Nuestros resultados muestran que la exposición a un AE durante 21 días atenúa la fortaleza de la memoria aversiva del CAS y restaura los niveles de BDNF en la CI. Asimismo, muestran que una exposición breve de 7 días al AE es suficiente para atenuar la respuesta aversiva ante un CAS fuerte y permitir la inducción, pero bloquear el mantenimiento de la LTP *in vivo* de la vía que va del núcleo basolateral de la amígdala a la corteza insular (BLA-CI). Adicionalmente, nuestros resultados muestran que la exposición al AE efectuado entre la sesión de adquisición y la prueba de aversión, es capaz de fortalecer el trazo de memoria del CAS, probablemente a través de un mecanismo de etiquetado y marcaje conductual. En conjunto, estos hallazgos proporcionan evidencia de que el AE es capaz de modular en diferentes ventanas temporales, un trazo de memoria aversivo restaurando los niveles de BDNF en la CI. Asimismo, es capaz de modificar el curso temporal de la expresión de plasticidad sináptica en áreas neocorticales implicadas en el procesamiento de estímulos aversivos. Finalmente, los resultados muestran también que la etapa dentro del proceso de memoria en la cual tiene lugar la exposición a un AE puede determinar la dirección de la modulación observada. Los presentes resultados subrayan la importancia de los ambientes enriquecidos como potenciales moduladores de los procesos de memoria asociados a eventos estresantes.

ABSTRACT

Long-term exposure to an enriched environment (EE) has demonstrated a remarkable ability to modulate the physiological impact of aversive stimuli, promoting adaptive attitudes, as well as the development of resilience to stressful situations. Likewise, it is known that EE can act as a natural homeostatic modulator, being able to regulate synaptic plasticity such as long-term potentiation (LTP). These effects are known to be related to increased levels of some trophic factors, such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF), which has been considered a regulatory protein for synaptic plasticity in the adult brain. Our previous studies have demonstrated that in the insular cortex (IC), a brain region of the temporal lobe implicated in the acquisition, consolidation, and retention of conditioned taste aversion (CTA) task, BDNF can reverse the CTA memory deficit caused by a protein synthesis inhibitor. In this context, the model known as Behavioral tagging (BT) constitutes a framework that explains how salient or novel events are capable of strengthen weak memory traces encoded in critical time windows before or after the novel experience. However, at present the optimal time window to carry out the intervention with an EE to deploy its modulation capacity of both the salience of the stimuli and the expression of synaptic plasticity is not yet clearly delimited. The present study aims to evaluate the effects of exposure to an enriched environment on the strength of an aversive memory, as well as on the efficiency of synaptic communication, using the CTA task and in vivo LTP at the basolateral amygdala - insular cortex pathway in adult rats. Our results show that exposure to an EE for 21 days attenuates the strength of CTA aversive memory and restores the IC BDNF levels. Likewise, they show that a brief exposure of 7 days to EE is sufficient to attenuate the aversive response to a strong CTA and allows the induction but block the maintenance of in vivo BLA-IC LTP. Furthermore, our results show that exposure to EE carried out between the acquisition session and the aversion test is capable of strengthen the CTA memory trace, probably through BT mechanisms. In summary, the present findings provide evidence that EE is able to modulate an aversive memory trace at different time windows by restoring BDNF levels in the IC. They also show that EE modifies the expression of synaptic plasticity at neocortical areas involved in aversive stimuli processing, and that the memory stage at which the exposure to EE occurs determines the direction of the observed modulation. The present results highlight that environmental manipulations could be used as a modulator for stress-associated memory processes.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------|---|
| ACTH | Hormona adrenocorticotrópica |
| AE | Ambiente enriquecido |
| AMPA | Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico |
| ANOVA | Análisis de varianza |
| ARNm | Ácido ribonucleico mensajero |
| BDNF | Factor Neurotrófico derivado del Cerebro |
| BLA | Amígdala basolateral |
| CA1 | Cuerno de Amón-región 1 |
| CA2 | Cuerno de Amón-región 2 |
| CA3 | Cuerno de Amón-región 3 |
| CaMKII | Proteína cinasa dependiente de calcio-calmodulina tipo II |
| CAS | Condicionamiento de aversión al sabor |
| CI | Corteza insular |
| CIS | Estrés por inmovilización crónica |
| EC | Estímulo condicionado |
| EI | Estímulo incondicionado |
| Eje HPA | Hipotálamo-hipofisario-adrenal |
| E-LTP | Fase temprana de la potenciación de largo plazo |
| GluR1 | Subunidad 1 de receptores AMPA |
| HFS | Estimulación de alta frecuencia |
| IA | Evitación inhibitoria |
| KIF1A | Proteína de la familia de las cinesinas 3 |
| LiCl | Cloruro de litio |
| L-LTP | Fase tardía de la potenciación de largo plazo |
| LTM | Memoria de largo plazo |
| LTP | Potenciación de largo plazo |
| mGluR5 | Receptor metabotrópico de glutamato 5 |
| NMDA | Receptores N-metil-D-aspartato |
| NPB | Núcleo parabraquial del puente |
| NR2B | Subunidad 2B de receptor NMDA |
| NTS | Núcleo del tracto solitario |
| PKM ζ | Proteína cinasa M ζ |
| PRP | Productos relacionados a la plasticidad |
| RC | Respuesta condicionada |
| STC | Hipótesis de etiquetado y marcaje sináptico |
| TEPT | Trastorno de estrés postraumático |
| TH | Tirosina hidroxilasa |
| TrKB | Receptor de proteína tirosina cinasa |
| VPM | Núcleo ventro-posterior medial del tálamo |
| VTA | Área tegmental ventral |
| Zif-268 | Proteína de respuesta de crecimiento temprano 1 |

INTRODUCCIÓN

Los seres vivos poseen la habilidad innata de captar información de su entorno y ajustar su comportamiento en respuesta a nuevas experiencias que deben ser almacenadas para su supervivencia (Moncada, Ballarini y Viola, 2015). En este sentido, el aprendizaje se refiere al proceso mediante el cual un organismo adquiere nueva información, mientras que la memoria se define como el proceso mediante el cual se almacena y recupera la información adquirida (Bear y Connors, 2004; Kandel, 2001).

Dentro del ámbito de las neurociencias, la consolidación de la memoria se refiere a la progresiva estabilización de la memoria de largo plazo después de la adquisición de la información (Dudai, 2004). La consolidación se revela como un proceso esencial para discernir entre la información valiosa y la prescindible. Aquella información que no se refuerza y consolida con el tiempo tiende a disiparse. La fuerza de una memoria también puede estar asociada a contextos específicos, por ejemplo, las memorias aversivas son rápidamente almacenadas y son difíciles de olvidar (Cahill y McGaugh, 1998; Hamann et al., 1999; Tambini et al., 2017; Dunsmoor et al., 2022).

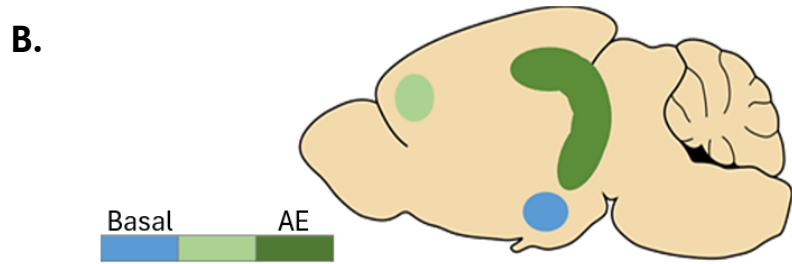
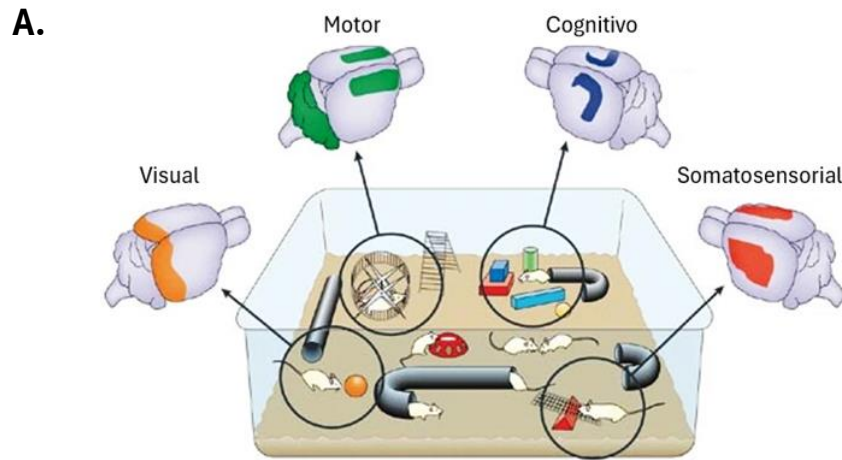
En este sentido diversas investigaciones han demostrado que la novedad desencadena procesos neuromoduladores que priorizan la información relevante para los organismos en memorias de largo plazo. Estas mejoras se basan en una serie de procesos neuroquímicos endógenos que garantizan la adecuada adquisición y consolidación de la memoria (Shohamy y Adcock, 2010; Lisman, et al., 2011; Schwarze et al., 2012; McGaugh, 2015).

Ambientes enriquecidos

Diversas investigaciones han demostrado la relevancia de los factores ambientales en el comportamiento. En particular, en el estudio de la interacción ambiente-organismo, el impacto del paradigma del enriquecimiento ambiental refuerza el papel crucial de la experiencia en el desarrollo del sistema nervioso y su manifestación en la conducta.

En 1911, S. Ramón y Cajal sugirió que el ejercicio cerebral podría establecer nuevas y más numerosas conexiones entre las neuronas cerebrales. Posteriormente, en 1949, Hebb postuló el concepto de “ambiente enriquecido”, dadas las observaciones de que los animales criados en entornos enriquecidos durante la infancia podrían experimentar cambios cerebrales permanentes asociados con una mejora en las capacidades de resolución de problemas (Renner y Rosenzweig, 1987).

El ambiente enriquecido (AE) se describe como un modelo en el que, mediante cambios novedosos y más complejos de las condiciones estándar de alojamiento de los animales, se facilita y mejora la estimulación sensorial, cognitiva y motora (Nithianantharajah y Hannan, 2006), este modelo incluye tanto objetos de diferentes texturas, colores, tamaños y formas, como actividad física y social de los animales produciendo alteraciones anatómicas y fisiológicas en el cerebro (Figura 1A). Los primeros estudios sobre los efectos del ambiente enriquecido mostraban una amplia gama de cambios plásticos en el cerebro de roedores. Rosenzweig y colaboradores en 1962, mostraron que los animales que experimentaron la exposición al nuevo entorno enriquecido tenían cerebros más pesados que las ratas alojadas en condiciones estándar, sugiriendo que el ambiente enriquecido había causado estos cambios neuroanatómicos (Figura 1B) (Rosenzweig et al., 1962). Poco después, se demostró que también hubo un aumento en el grosor cortical en los animales enriquecidos (Diamond et al., 1966) y posteriormente, varios estudios revelaron que el ambiente enriquecido incrementaba la complejidad de la arborización dendrítica (Globus et al., 1973; Volkmar y Greenough, 1972).



| | Hipocampo | Corteza Prefrontal | Amígdala |
|------------------------|-----------|--------------------|----------|
| Supervivencia celular | ↑ | ↑ | sd |
| Complejidad dendrítica | ↑ | ↑/↓ | - |
| Plasticidad sináptica | ↑ | ↑ | ↑ |
| Neurotrofinas | ↑ | ↑ | ↑ |
| Hormonas | ↑ | - | - |
| Neurotransmisores | ↑ | ↓ | ↓ |
| Factores inmunológicos | ↑ | ↓ | sd |
| Otras células | ↑ | ↑ | - |

Figura 1. Esquema ilustrativo del enriquecimiento ambiental y sus efectos positivos en las diferentes áreas cerebrales. **A.** El enriquecimiento ambiental promueve la estimulación de las cortezas somatosensorial (roja) y visual (naranja). Así mismo, promueve la estimulación cognitiva (azul) por medio de reconocimiento de objetos y exploración espacial activando el hipocampo. Mejora la actividad motora (verde), incluyendo las habilidades motoras finas (Modificado de Nithianantharajah y Hannan, 2006). **B.** Efectos morfológicos y moleculares del enriquecimiento (AE) en regiones corticolímbicas. La coloración refleja la intensidad de los efectos del AE en cada región. ↑ mayor actividad. ↓ disminución de la actividad. - sin cambios. sd sin datos disponibles (Modificado de Smail et al., 2020).

El enriquecimiento ambiental como modulador de los estímulos aversivos

Existe evidencia experimental que reporta que los animales alojados en un ambiente enriquecido presentan un menor impacto psicológico o fisiológico por parte de los estresores, en comparación con los animales alojados en condiciones estándar (Crofton, Zhang, y Green, 2015; Fox, Merali, y Harrison, 2006; Singhal et al., 2014). En este sentido se ha descrito que animales expuestos a ambiente enriquecido que son estresados levemente mediante el paradigma conductual de evitación pasiva responden de manera sobresaliente en el laberinto de Morris y en la locomoción en un campo abierto respecto a los animales alojados en condiciones estándar, sin embargo, estos no presentan diferencias con el rendimiento de animales expuestos a un ambiente enriquecido en ausencia de estrés, sugiriendo que la exposición a un enriquecimiento ambiental propicia una estabilidad emocional en el animal, presentando una respuesta con menores índices de ansiedad ante la exploración de entornos y objetos desconocidos (Larsson, Winblad y Mohammed, 2002). Además, se ha observado que los animales expuestos a un ambiente enriquecido se habitúan rápidamente a la novedad, lo que reduce el comportamiento ansioso y mejora su capacidad para hacer frente a los desafíos (Fuss et al., 2010; Hendershott et al., 2016; Voss et al., 2013).

En este orden de ideas, existe evidencia de que la interacción social dentro de un protocolo de enriquecimiento ambiental es capaz de modificar la saliencia de los estímulos aversivos en la tarea del condicionamiento de aversión a los sabores (CAS) (Smith, Neill, y Costall, 1998). En otra investigación en la que se evaluaron los efectos del ambiente enriquecido en el procesamiento de un aprendizaje aversivo inducido por un condicionamiento de miedo contextual, se observó que las ratas expuestas a AE mostraban una reducción en la conducta de miedo asociado con los eventos aversivos, presumiblemente debido a una regulación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA), aumentando la expresión del ARNm del receptor de glucocorticoides en el hipocampo (Barbelivien et al., 2006).

Por su parte, Beckman y Bardo demostraron que el ambiente enriquecido reduce el valor del incentivo de una señal asociada a recompensa, mostrando una menor búsqueda de ésta respecto a animales alojados en condiciones estándar. Sugiriendo además que la reducción del valor del incentivo es mediada por la señalización dopaminérgica en los animales enriquecidos (Beckmann y Bardo, 2012).

Asimismo, se han observado modificaciones en los patrones de actividad cerebral, de manera particular, en regiones cerebrales involucradas en el procesamiento de tareas de condicionamiento de tipo aversivo en animales expuestos a un AE, atribuyendo este fenómeno a cambios en la activación metabólica cerebral (Gonzalez-Lima et al., 1994; Izquierdo et al., 1997; Turner, Yang, y Lewis, 2002). En este sentido, Nikolaev y colaboradores reportaron una disminución de la actividad neuronal en la amígdala, a través de la expresión de C-Fos, durante la tarea de evitación pasiva en ratas expuestas a un ambiente enriquecido (Nikolaev et al., 2002). De manera similar, Leger y colaboradores observaron una reducción en la actividad metabólica medida a través de la actividad de la citocromo oxidasa en la amígdala de ratones alojados en AE, durante la ejecución del paradigma de evitación pasiva, sugiriendo que esta disminución en la actividad es capaz de atenuar un comportamiento de tipo ansioso (Leger et al., 2012).

Modulación de respuestas aversivas y modificación de la señalización neuroquímica generada por el enriquecimiento ambiental: participación del BDNF

El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) desempeña un papel crucial en los procesos de memoria. En este sentido, se ha descrito un aumento significativo en el RNAm de BDNF en el hipocampo tras la adquisición de tareas espaciales, como el laberinto acuático de Morris, el laberinto radial, el condicionamiento de miedo al tono, así como el condicionamiento de miedo contextual (Kesslak et al., 1998; Hall, Thomas y Everitt, 2000; Mizuno et al., 2000; Alonso et al., 2002).

En concordancia con lo anterior, se ha comprobado que la interferencia con la síntesis de BDNF o la disponibilidad de su receptor TrkB impacta negativamente la formación de la memoria de largo plazo. A modo de ejemplo, los ratones modificados genéticamente (BDNF+/-) experimentan dificultades en su desempeño en la tarea del laberinto acuático de Morris (Linnarsson, Bjorklund y Ernfors, 1997) y en el condicionamiento de miedo contextual (Liu et al., 2004). De igual manera, la supresión de la expresión del ARNm de BDNF, lograda mediante la infusión de oligonucleótidos antisentido de BDNF o la aplicación de anticuerpos anti-BDNF en el hipocampo antes de la adquisición de bloques de entrenamiento en tareas de evitación inhibitoria y laberinto de brazo radial, también incide en el proceso de formación de la memoria a largo plazo (Ma et al., 2011; Mizuno et al., 2000; Alonso et al., 2002). Adicionalmente, se ha demostrado que las manipulaciones genéticas y

farmacológicas de la señalización del BDNF antes de un entrenamiento tienen un impacto negativo en la formación de la memoria (Gorski et al., 2003; Koponen et al., 2004; Monteggia et al., 2004; Heldt et al., 2007).

En este sentido, se ha demostrado que el enriquecimiento ambiental, es capaz de afectar sistemas de neurotransmisión (serotoninérgico, dopaminérgico, colinérgico, glutamatérgico) (Eckert y Abraham, 2012), varios componentes del sistema inmune como linfocitos T y células NK (Benaroya-Milshtein et al., 2004), así como los niveles de ciertas neurotrofinas (Singhal et al., 2014; Zhang et al., 2016), por lo que se considera como un modulador potencial de la función cerebral (Kempermann, 2019). Actualmente se conoce que el estrés conduce al desarrollo de comportamientos similares a la depresión o la ansiedad (Golden et al., 2011; Lehmann y Herkenham, 2011), y en este sentido, BDNF constituye el primer agente regulado negativamente en diferentes estructuras cerebrales que contribuye claramente a la aparición de conductas desadaptativas en los animales (Shilpa et al., 2017). De igual manera, se ha observado que un breve episodio de estrés por inmovilización conduce a un rápido incremento en la expresión de BDNF en el hipocampo, el hipotálamo y la pituitaria, estructuras implicadas en la modulación del eje HPA y mantenimiento de la homeostasis (Givalois et al., 2004; Rage et al., 2002; Marmigere et al., 2003). Destacando que este rápido aumento en la expresión de BDNF precede a la activación de neuronas que secretan arginina-vasopresina (AVP) y la hormona liberadora de corticotropina (CRH), sugiriendo así que BDNF podría desempeñar la función de un mensajero intracelular que responde al estrés (Givalois et al., 2004).

En contraposición, la exposición a AE es capaz de revertir las deficiencias cognitivas y disminuir las conductas ansiosas inducidas por estrés, produciendo incrementos en los niveles de BDNF, y modulando la actividad de los astrocitos, así como de los receptores de glucocorticoides en el hipocampo, la corteza frontal y la amígdala (Figura 2) (Ashokan et al., 2016; Shilpa et al., 2017; McQuaid et al., 2018; Shen et al., 2019).

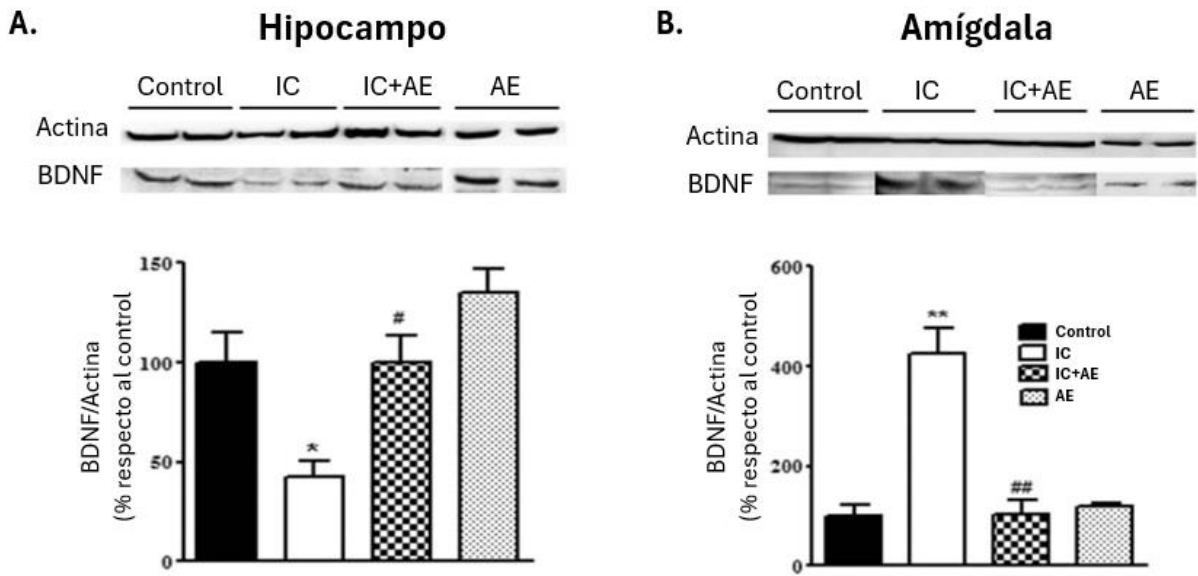


Figura 2. El ambiente enriquecido normaliza la expresión alterada de BDNF inducida por estrés mediante inmovilización crónica (IC) en diferentes estructuras cerebrales. A. La exposición a un ambiente enriquecido (AE) restaura los niveles a la baja de BDNF inducida por IC en el hipocampo. **B.** Los niveles de BDNF expresados al alza en animales estresados son regulados en animales expuestos a un ambiente enriquecido en la amígdala. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ respecto al control. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ respecto a CIS (Modificado de Shilpa et al., 2017).

Por su parte, Bekinschtein y colaboradores mostraron que la exposición de roedores a ambientes enriquecidos incrementa la expresión de BDNF y la regulación epigenética del gen que lo codifica (Bekinschtein et al., 2011).

Actualmente el BDNF es considerado una proteína imprescindible para la regulación de los mecanismos relacionados con la memoria de largo plazo en el cerebro adulto (Ickes et al., 2000; Bekinschtein et al., 2011), en este sentido, una investigación reciente de Tanichi, describió que existe un incremento en la expresión de ARNm de BDNF en el hipocampo asociado tanto a la neurogénesis como a la neuroplasticidad de animales estresados (Tanichi et al., 2018).

De manera análoga se ha descrito que la liberación de BDNF es capaz de regular procesos de aprendizaje y memoria en diferentes estructuras cerebrales. En la amígdala se ha observado un incremento en los niveles de esta proteína, así como en la fosforilación de los receptores TrkB como consecuencia de la tarea de condicionamiento al miedo (Rattiner et al., 2004). En el hipocampo, se ha descrito que el aumento en los niveles de BDNF generados por la exposición a ambientes enriquecidos, es capaz de regular procesos de aprendizaje y memoria. Específicamente, al modular de manera positiva la expresión de la proteína KIF1A, molécula esencial para el aprendizaje de miedo al contexto

(Kondo, Takei, y Hirokawa, 2012). Del mismo modo, recientes investigaciones de nuestro laboratorio muestran que la infusión aguda de BDNF en la corteza insular (CI) (en la misma concentración empleada para inducir una potenciación duradera de la eficacia sináptica en la proyección BLA-CI), fortalece el trazo de memoria del CAS, estos hallazgos mostraron que la administración de BDNF en la corteza insular adulta es suficiente para incrementar un trazo de memoria aversiva (Martínez-Moreno, Rodríguez-Durán, y Escobar, 2016). Aunado a lo anterior, otro estudio de nuestro grupo de trabajo demostró que la infusión aguda de BDNF en la corteza insular es capaz de promover la extinción del CAS (Rodríguez-Serrano et al., 2014).

El condicionamiento de aversión al sabor

Desde la perspectiva evolutiva, la necesidad de un aprendizaje rápido se destaca cuando una conducta pone en peligro la vida del animal (Breed y Moore, 2012). La ingesta de comida venenosa o contaminada puede generar rápidamente una aversión a ese tipo de alimento tras una única experiencia. La emesis, o proceso de vomitar el alimento tóxico, implica no solo la pérdida de esa comida, sino también de otros alimentos similares, y a menudo, la capacidad de alimentarse por un tiempo. Para animales con limitaciones energéticas, estas pérdidas pueden ser significativas. Por lo tanto, la evolución ha favorecido la capacidad de aprender velozmente a evitar alimentos tóxicos y retener esa información en una memoria duradera, conocido como aprendizaje de la aversión al gusto (Breed y Moore, 2012).

Desde una perspectiva experimental, el CAS se ha considerado como un importante paradigma de aprendizaje en el que las diferentes fases del aprendizaje, incluidas la adquisición, la retención y la extinción, se pueden estudiar de forma sistemática e independiente. Entre sus características, se destaca que es posible generar una fuerte asociación entre el sabor y el malestar gástrico con una sola sesión de entrenamiento, además de la exhaustiva comprensión de la vía implicada en el procesamiento de la información (Escobar et al., 2002; Berman et al., 2003; Bermúdez-Rattoni et al., 2004; Foy y Foy, 2009).

El CAS es un tipo de condicionamiento clásico en el que el sabor actúa como estímulo condicionado (EC) y el malestar gástrico como estímulo incondicionado (EI), permitiendo que un estímulo gustativo adquiera la capacidad de generar una respuesta condicionada (RC). Los animales

adquieren el aprendizaje de la tarea cuando el estímulo aversivo es inyectado por vía intraperitoneal (Figura 3) (Ingram, 2001).

En 1955, John García, uno de los pioneros en la investigación de este condicionamiento, describió, por primera vez, que las ratas desarrollan aversión a soluciones con sabor dulce cuando éstas son seguidas por la aplicación de rayos gamma (García et al., 1955). Posteriormente, el mismo grupo de investigación utilizó cloruro de litio (LiCl) como estímulo aversivo, demostrando que una solución con sabor se asocia más fácilmente a la inducción de náusea que a la aplicación de choques eléctricos en las patas, lo cual comprobó que en este condicionamiento es importante que el estímulo aversivo sea de tipo visceral (García y Koelling, 1966).

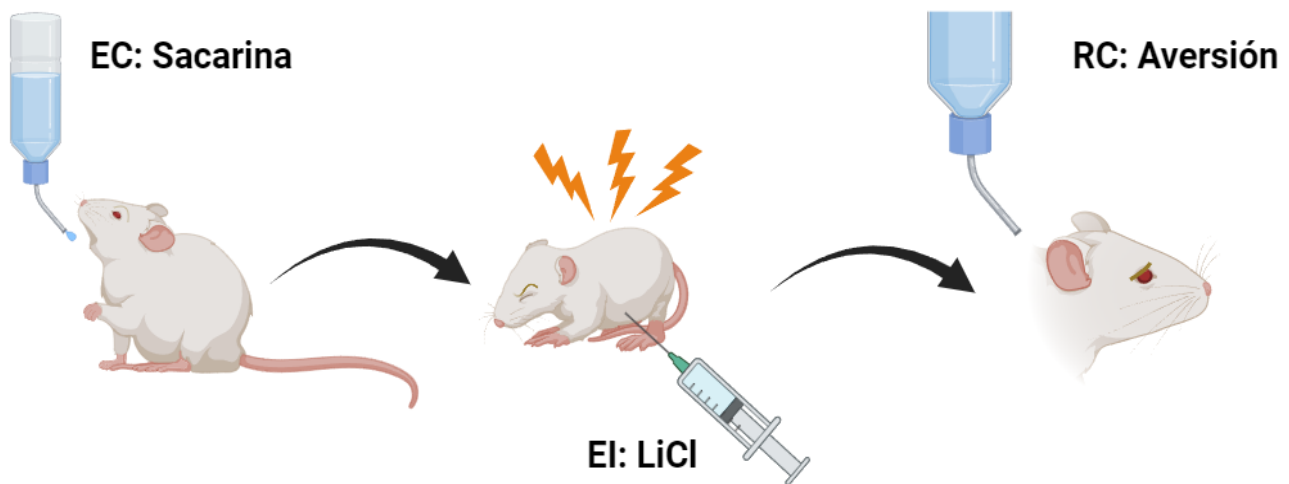


Figura 3. Condicionamiento de aversión al sabor. La asociación de un sabor novedoso (sacarina) con un malestar gástrico (inyección de LiCl) provoca el malestar gástrico, lo cual causa que el animal muestre aversión al estímulo, evitando su consumo (Figura creada en Biorender).

Los principios generales del CAS consisten en:

a) Si un animal consume un alimento con sabor y posteriormente experimenta malestar gástrico, en futuras experiencias con ese sabor, el animal evitará o reducirá drásticamente su consumo (García et al., 1985).

b) La fuerza de la aversión está directamente relacionada con la intensidad del sabor y del malestar, e inversamente relacionada con el intervalo entre la presentación del sabor y la inducción del

malestar. Este intervalo entre el EC y el EI puede durar horas, a diferencia de otros condicionamientos, en los cuales es necesario que el intervalo sea de segundos (García y Koelling, 1966).

c) Los estímulos gustativos se asocian más fácilmente a estímulos gástricos (García y Koelling, 1966).

El CAS requiere la formación de un trazo de memoria aversiva a partir de la asociación entre dos estímulos que convergen en la corteza insular. El estímulo gustativo activa la vía gustativa hasta llegar a la CI, formando así el trazo de memoria gustativa de tipo seguro (Bermúdez-Rattoni, 2004; Bermúdez-Rattoni et al., 2005). En cambio, el estímulo aversivo activa la CI a través de la amígdala, dando lugar a la formación de un trazo de memoria gustativa de tipo aversivo (Bermúdez-Rattoni, 2004; Bermúdez-Rattoni et al., 2005).

El sustrato neuroanatómico del CAS

El procesamiento de la información del sabor comienza en la cavidad oral con la activación de células quimiorreceptoras como resultado de la exposición a un sabor. Las células quimiorreceptoras, basales y de soporte en conjunto forman las yemas gustativas, pequeñas protuberancias en el epitelio de la lengua conocidas como papilas gustativas (Yarmolinsky et al., 2009; Carleton et al., 2010; Bear et al., 2016; Yiannakas y Rosenblum, 2017).

Las papilas gustativas de la lengua y el paladar están inervadas por tres nervios aferentes: la cuerda del tímpano, petroso mayor superficial y glossofaríngeo. Estos nervios conducen la información de los receptores gustativos al núcleo del tracto solitario (NTS), principalmente a través de los pares craneales facial (VII) y glossofaríngeo (IX), y del nervio vago (X) desde la laringe y la faringe (Bermúdez-Rattoni, 2004; Bermúdez-Rattoni et al., 2004; Carleton et al., 2010; Staszko y Boughter, 2020). Luego, el NTS, en ratas por ejemplo, establece sinapsis en el núcleo parabraquial del puente (NPB), desde donde se proyecta hacia varias regiones, como el hipotálamo lateral, el núcleo del nicho de la estría terminalis, los núcleos central y basolateral de la amígdala, y la zona parvocelular del núcleo ventroposteromedial del tálamo (VPM), que finalmente proyecta hacia la CI (Figura 4B) (Bermúdez-Rattoni, 2004; Bermúdez-Rattoni et al., 2004; Núñez-Jaramillo et al., 2010; Yiannakas y Rosenblum, 2017; Staszko y Boughter, 2020).

En cuanto a la información visceral relacionada con la irritación gástrica, esta se procesa a través del nervio vago, que proyecta hacia el NTS y posteriormente hacia el NPB, la amígdala y el núcleo paraventricular del hipotálamo (Bermúdez-Rattoni, 2004; Bermúdez-Rattoni et al., 2004; Staszko y Boughter, 2020; Yarmolinsky et al., 2009).

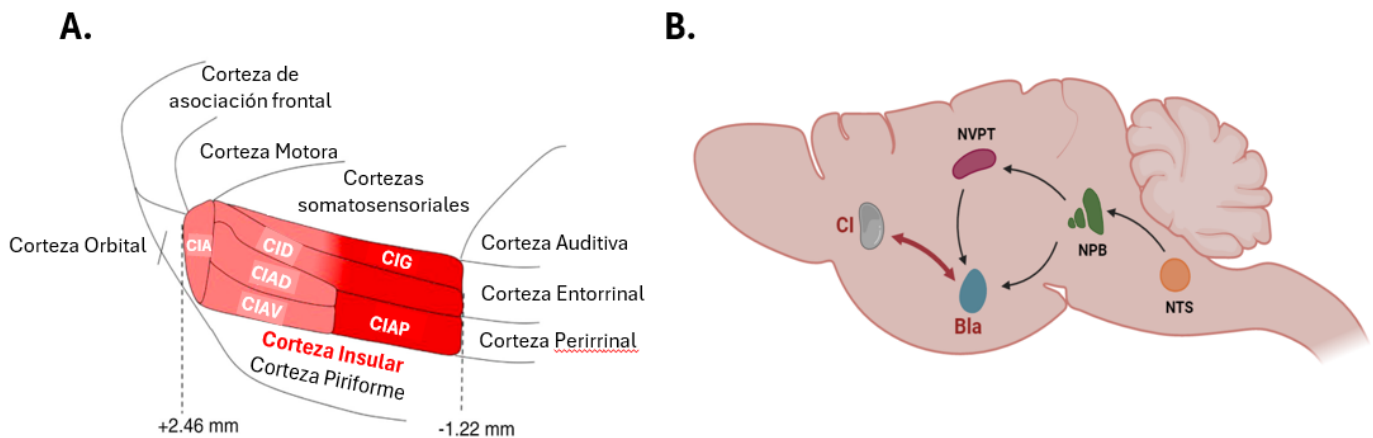


Figura 4. Anatomía de la corteza insular. **A.** Representación esquemática de la CI en el ratón, mostrando la corteza insular agranular (CIA), corteza insular agranular parte dorsal (CIAD), corteza insular agranular parte ventral (CIAV), corteza insular agranular parte posterior (CIAP), corteza insular disgranular (CID), corteza insular granular (CIG). **B.** 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 glossofaríngeo. Estos nervios llevan la información del sabor desde las células receptoras en la lengua al núcleo del tracto solitario (NTS) en el cerebro. A partir de este núcleo, la información es transferida a través del núcleo parabraquial (NPB) y del núcleo ventral posteromedial del tálamo (NVPT) tanto a la corteza como al núcleo basolateral amigdalino (Bla), el cual proyecta hacia la corteza gustativa primaria en la ínsula (CI). (Figura modificada en Biorender tomada de Bermúdez-Rattoni, 2014; Gogolla, 2017).

Hoy en día la CI es considerada como un nodo crucial de integración sensorial multimodal (Asya Rolls, 2023; Malezieux, Klein y Gogolla, 2023, 2023; Prilutski y Livneh, 2023). Así, la evidencia experimental señala a la CI como partícipe en los procesos de integración e interpretación de señales interoceptivas tales como hambre, sed y dolor (Wang et al., 2021; Labrakakis, 2023; Prilutskiy y Livneh, 2023), procesamiento de emociones (Etkin et al., 2015; Malezieux, Klein y Gogolla, 2023), integración multisensorial (Gogolla, 2017; Prilutski y Livneh, 2023), aprendizaje y memoria (Bermúdez-Rattoni, 2014; Gogolla, 2017; Rodríguez-Durán et al., 2017; Gutiérrez-Vera et al., 2022; 2023; Briones-Vidal et al., 2024), así como en la regulación del sistema inmune (Ramírez-Amaya y Bermúdez-Rattoni, 1999; Pacheco-López et al., 2013; Koren et al., 2021).

Desde el punto de vista citoarquitectónico la CI puede dividirse en tres áreas: granular (parte dorsal), disgranular (centro) y agranular (porción ventral) (Bermúdez-Rattoni, 2014; Gogolla, 2017; Staszko et al., 2020). La región granular se relaciona con áreas corticales viscerosensoriales, la disgranular con distintas modalidades gustativas, y la agranular con funciones de integración multimodal y límbico-autonómicas (Figura 4A) (Bermúdez-Rattoni, 2014).

El CAS y las respuestas estresantes

La supervivencia en el entorno natural conlleva una respuesta continua de adaptación a señales significativas. Este proceso implica, en primer lugar, la evaluación de la relevancia de un estímulo y, posteriormente, la ejecución de una acción apropiada hacia él (acercarse si es una recompensa, evitarlo si es amenazante o peligroso). La capacidad de detectar y procesar de manera óptima las características clave y destacadas de las señales, conocida como saliencia o prominencia, es un principio central que guía el comportamiento adaptativo (Chakraborty, Chattarji y Jeanneteau, 2021).

En los seres vivos, el estrés, por ejemplo, no solo intensifica la prominencia de las señales aversivas, sino que también reduce la prominencia de las señales adaptativas. Este desequilibrio ha sido ampliamente documentado en individuos que sufren de trastorno de estrés postraumático (TEPT), una condición inducida por el estrés que conlleva una carga significativa y carece de un tratamiento farmacológico eficaz (Chakraborty, Chattarji y Jeanneteau, 2021).

En este contexto, diversas investigaciones han demostrado que el CAS es capaz de generar un malestar prominente en los animales, además de inducir la liberación de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) (Sugawara et al., 1988), activar el eje HPA (Hennessy et al., 1980) y aumentar los niveles de glucocorticoides plasmáticos (Jahng et al., 2004; Spencer et al., 2005).

Plasticidad sináptica

Las sinapsis pueden cambiar su estructura y función, fortaleciéndose o debilitándose con el tiempo de manera dependiente de la actividad. Se cree que esta capacidad, conocida como plasticidad sináptica, es un correlato celular de los procesos de aprendizaje y memoria (Okuda et al., 2021). La potenciación de largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés *long-term potentiation*) es un fenómeno que ha contribuido sustancialmente al estudio de los procesos de aprendizaje y memoria (Abraham et al., 2019; Bliss et al., 2018). La LTP fue descrita inicialmente en 1973 por Bliss y Lomo, quienes reportaron que al aplicar breves trenes de alta frecuencia en la vía que va del patrón perforante al giro dentado del hipocampo de conejos, aumentaba la fuerza de las conexiones sinápticas (Bliss y Lomo, 1973). Actualmente es definido como un incremento prolongado en la eficiencia sináptica dependiente de la actividad, y se conoce que puede ser inducida en diferentes zonas cerebrales (Mayford et al., 2012; Herring y Nicoll, 2016; Nicoll, 2017; Bliss et al., 2018; Baltaci et al., 2019; Okuda et al., 2021).

En este sentido la LTP presenta características que logran explicar a nivel molecular y celular los procesos que subyacen a la memoria ya que su duración prolongada, así como su funcionamiento ocurren acorde al postulado de Hebb (Nicoll, 2017; Baltaci et al., 2019). La cooperatividad se manifiesta cuando la estimulación simultánea de múltiples aferencias puede superar el umbral necesario para inducir la LTP. Por otro lado, la asociatividad ocurre cuando la intensa actividad de una aferencia, suficiente para desencadenar la LTP, puede facilitar a otras sinapsis más débiles, incapaces de generar LTP por sí solas, siempre que la actividad de ambas aferencias ocurra de manera simultánea. Finalmente, la especificidad es una propiedad en la que solo experimentarán modificaciones en la respuesta sináptica aquellas fibras que fueron activadas por el estímulo de alta frecuencia (Yasuda, et al., 2003; Baltaci et al., 2019).

Por otra parte, la LTP se divide en una fase temprana (E-LTP, por sus siglas en inglés *Early long-term potentiation*) que no depende de la síntesis de proteínas, con una duración breve de 1 a 3 horas, y una fase tardía (L-LTP, por sus siglas en inglés *Late long-term potentiation*) que implica la activación de factores de transcripción, depende de la síntesis proteica y conlleva modificaciones estructurales sostenidas durante al menos 24 horas (Baltaci et al., 2019). Respecto al sitio de síntesis de proteínas, se ha documentado su participación tanto en el compartimento dendrítico como en el somático

(Reymann y Frey, 2007), y la disponibilidad de estas proteínas contribuye al fortalecimiento de las sinapsis recientemente potenciadas (Reymann y Frey, 2007; Bliss et al., 2018).

Hipótesis de etiquetado y captura sináptica

La hipótesis de etiquetado y captura sináptica (STC, por sus siglas en inglés *Synaptic tagging and capture*) proporciona un marco teórico para comprender los cambios plásticos de larga duración en el cerebro, incluyendo la formación y mantenimiento de memorias de largo plazo.

Según esta hipótesis, en el momento de inducción de una LTP, se establece una etiqueta local transitoria cuya función es capturar los productos relacionados a la plasticidad (PRPs) disponibles para estabilizar la fuerza sináptica (Bliss et al., 2018; Okuda et al., 2021; Ibrahim, Benoy y Sajikumar, 2022). En la actualidad, la hipótesis de etiquetado y captura sináptica se considera parte integral de los fundamentos neurobiológicos del aprendizaje y la memoria.

En cuanto a la naturaleza bioquímica de la etiqueta, se han planteado diversas teorías, que van desde la fosforilación temporal de una o más proteínas asociadas a la sinapsis, a través de moléculas específicas como los receptores tirosina-cinasas (TrkB), hasta cambios estructurales transitorios en las espinas dendríticas que permiten la entrada de proteínas para ayudar a estabilizar la mejora sináptica (Redondo y Morris, 2011; Bliss et al., 2018). Respecto a los PRPs, se ha sugerido la participación de RNA mensajeros (Doyle y Kiebler, 2011) y una variedad de proteínas cuya síntesis puede ser afectada por la microinfusión de inhibidores de la síntesis proteica, como anisomicina, emetina y rapamicina, después de eventos de plasticidad (De Carvalho Myskiw et al., 2013, 2014; Frey y Frey, 2008; Okada et al., 2009; Lopes da Cunha et al., 2022). Entre los candidatos se incluyen Homer 1 (Okada et al., 2009), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Lu et al., 2011), y la cinasa M ζ (PKM ζ) propuesta por Sajikumar y Korte (Sajikumar y Korte, 2011).

En cuanto a BDNF, la evidencia anatómica y funcional respalda su papel como PRP (Okuda et al., 2021). Esta neurotrofina no sólo se almacena y libera tanto presináptica como postsinápticamente en las sinapsis glutamatérgicas (Lessmann y Brigadski, 2009; Matsuda et al., 2009; Jakawich et al., 2010; Dieni et al., 2012), sino que también se regula positivamente durante la L-LTP (Patterson et al., 2001). Lu y colaboradores por su parte demostraron que BDNF puede actuar como un PRP durante la inducción

de una E-LTP dando como resultado su fortalecimiento, en tanto que la inhibición de los receptores TrkB específicos para BDNF, previenen la captura de los PRPs y en consecuencia la formación de la L-LTP.

Los efectos del BDNF exógeno también han arrojado información sobre la función del BDNF como PRP en los mecanismos de plasticidad sináptica. Barco y colaboradores (2005) mostraron que la administración exógena de BDNF en ratones knockout para BDNF transforma una E-LTP en una L-LTP, evidenciando su papel crucial en este proceso. Además, la infusión de BDNF incrementa la fuerza sináptica en diversas regiones, como el giro dentado del hipocampo, las fibras musgosas que proyectan a CA3, las colaterales de Schaffer a CA1, la vía del núcleo basolateral amigdalino a la corteza insular y la vía del núcleo geniculado lateral a la corteza visual (Jiang et al., 2001; Escobar et al., 2003; Barco et al., 2005; Diogenes et al., 2007; Messaoudi et al., 2007; Gómez-Palacio-Schjetnan y Escobar, 2008; Tebano et al., 2008; Ji et al., 2010).

Recientemente y derivada de la hipótesis anterior, ha surgido la hipótesis de etiquetado y marcaje conductual (BT, por sus siglas en inglés *Behavioral tagging*). Esta hipótesis explica cómo una experiencia conductual es capaz de inducir cambios plásticos en el cerebro que fortalecerá y mantendrá los trazos de memoria a través de un proceso de etiquetado y marcaje sináptico (Moncada, Viola y Ballarini, 2015).

La investigación en torno al BT es aún incipiente, no obstante, y pese a su reciente conformación está brindando valiosa información acerca de los mecanismos celulares que subyacen a la memoria de largo plazo (Gros y Wang, 2018; Nomoto y Inokuchi, 2018; Viola et al., 2014). La primera evidencia de que la formación de la memoria de largo plazo implica un proceso de etiquetado conductual se obtuvo mediante una tarea de aprendizaje asociativo dependiente del hipocampo en ratas, conocida como evitación inhibitoria (IA). Para ello se diseñó un experimento que combinaba un entrenamiento débil en IA, incapaz de inducir una memoria de largo plazo, con una breve exposición de 5 minutos a un campo abierto novedoso (Moncada y Viola, 2007). La exposición al campo abierto induce la síntesis de PRP, los cuales pueden ser capturados por las etiquetas generadas por el aprendizaje débil, dando por resultado que la memoria de corto plazo transite hacia una memoria de largo plazo (Moncada y Viola, 2007).

En este sentido, también se ha reportado que la presentación de un sabor gustativo novedoso minutos después de la sesión de adquisición de un CAS débil fortalece la memoria aversiva. Confirmando que los estímulos novedosos son capaces de promover la síntesis de PRPs que

potencialmente podrían ser capturados por las etiquetas sinápticas generadas durante el aprendizaje, transformando así las memorias débiles o de corto plazo en memorias robustas o de largo plazo (Ballarini et al., 2009). En consonancia con lo anterior, estudios previos de nuestro laboratorio revelan que el entrenamiento en el CAS bloquea la capacidad de inducir LTP in vivo en la vía BLA-CI, demostrando que este condicionamiento modula los cambios duraderos en la fuerza sináptica en la CI necesarios para la formación y persistencia de la memoria aversiva (Rivera-Olvera et al., 2016; Rodríguez-Duran et al., 2011; Rodríguez-Duran et al., 2017).

Plasticidad homeostática

Hoy en día, la neurociencia cognitiva reconoce la existencia de dos grandes vertientes en la expresión de plasticidad sináptica: la plasticidad hebbiana y la homeostática. La plasticidad hebbiana comprende las modificaciones que tienden a desestabilizar las propiedades de la red neuronal, provocando cambios progresivos en las funciones de esta (Figura 5A). Por su parte, la plasticidad homeostática comprende las modificaciones en las que la neurona activa mecanismos celulares que tienden a estabilizar la actividad, modificando los umbrales de respuesta ante subsecuentes cambios de la eficiencia sináptica (Figura 5B). Un ejemplo de plasticidad homeostática es la metaplasticidad, entendida como el cambio en la habilidad para inducir subsecuente plasticidad sináptica, fenómeno que hoy en día se considera fundamental tanto para el mantenimiento de la homeostasis de las sinapsis, como para la modulación de la información y preservación de los trazos de memoria (Perez-Otano y Ehlers, 2005; Abraham, 2008; Wefelmeyer, Puhl y Burrone, 2016). Es importante destacar que la plasticidad hebbiana y la homeostática actúan de manera orquestada ajustando la actividad sináptica y de sistemas para su adecuado funcionamiento (Figura 5).

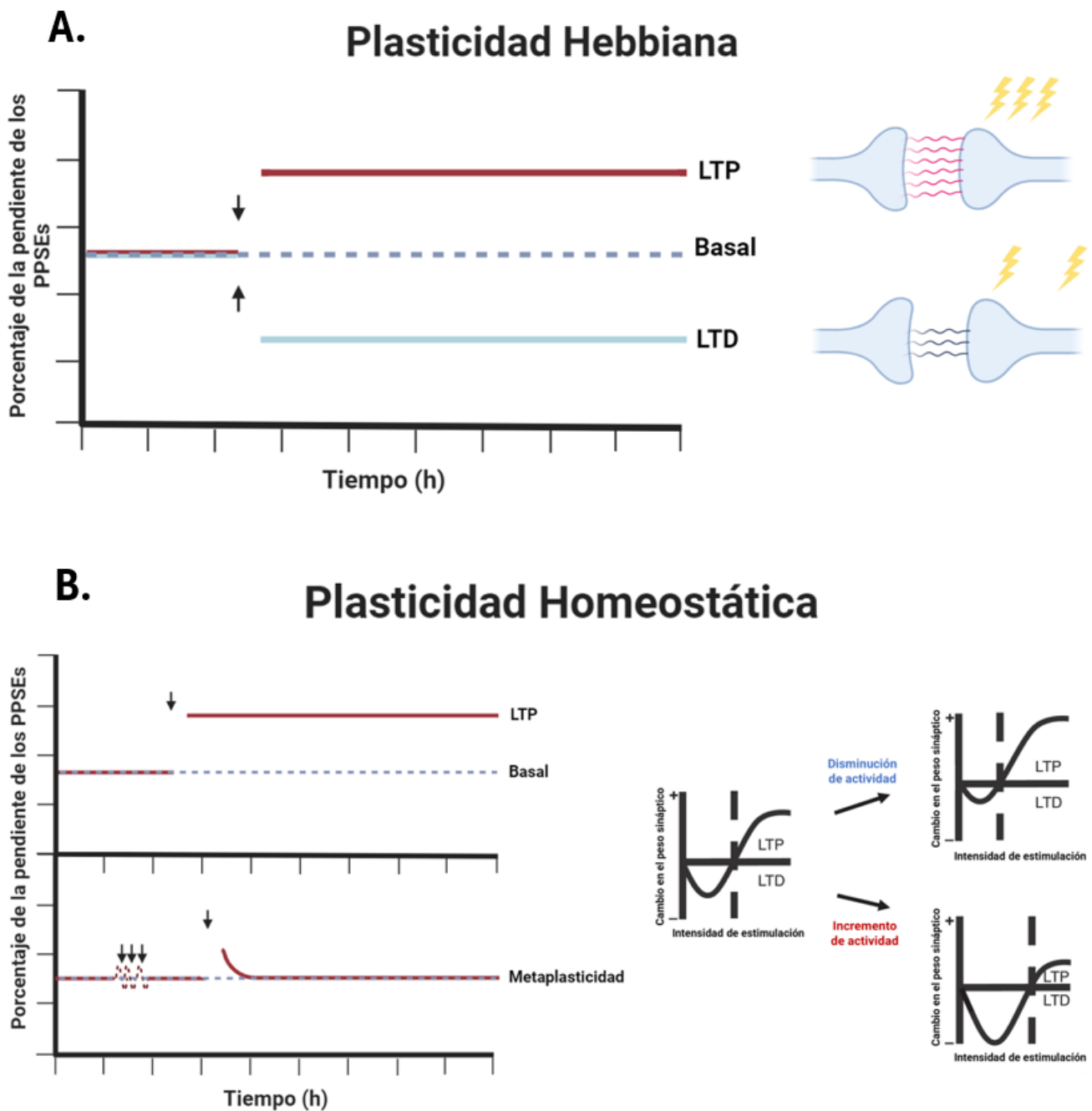


Figura 5. Representación esquemática de la relación entre la plasticidad Hebbiana y la homeostática. **A)** La plasticidad hebbiana comprende las modificaciones que tienden a desestabilizar las propiedades de la red neuronal, provocando incrementos en la eficiencia sináptica (LTP) así como decrementos en ésta (LTD). **B)** La plasticidad homeostática comprende los mecanismos celulares tendientes a estabilizar la actividad, modificando los umbrales de respuesta ante cambios de la eficiencia sináptica. En el panel izquierdo, se muestra el fenómeno de metaplasticidad donde la actividad previa de las conexiones neuronales determina la expresión de plasticidad sináptica. En el panel derecho se esquematiza el modelo *Bienenstock-Cooper-Munro* (BMC, por sus siglas en inglés) que describe el desplazamiento en el umbral de inducción (línea punteada) necesario para generar un cambio en la fuerza sináptica ya sea fortaleciéndola o debilitándola. Por ejemplo, si una red neuronal ha experimentado actividad intensa por un período prolongado, se produce el corrimiento del umbral necesario para favorecer la expresión de LTD. (Figuras modificadas en Biorender tomadas de Rodríguez-Duran et al., 2017; Reyes García et al., 2021; Keck et al., 2017).

Actualmente, se ha señalado a la metaplasticidad como un fenómeno relevante observado conductualmente, presentándose después de una experiencia sensorial alterada, como estrés, alteraciones visuales y la exposición a un ambiente enriquecido (Kirkwood et al., 1996; Duffy et al., 2001; Philpot et al., 2003; Irvine et al., 2006). En este sentido, aunque aún muy poco explorado, se ha descrito que los AE pueden actuar como reguladores homeostáticos naturales que responden ante las necesidades del sistema, manteniendo su homeostasis (Hegde, Suresh y Mitra, 2020). El AE es capaz tanto de facilitar la inducción de la LTP y aumentar el rendimiento en tareas dependientes del hipocampo (Ohline y Abraham, 2019) como promover una rápida reversión de la LTP en su fase temprana (Xu et al., 1998; Manahan-Vaughan y Braunewell, 1999; Gutiérrez Vera et al., 2023), e incluso revertir una LTP que se ha mantenido estable durante semanas (Abraham et al., 2002).

Investigaciones recientes han revelado que la inducción de LTP experimenta modificaciones significativas debido al entrenamiento previo en algunas tareas conductuales, a manera de expresión homeostática (Escobar y Derrick, 2007; Monfils y Teskey, 2004; Quinlan, Lebel, Brosh, y Barkai, 2004). En este sentido, investigaciones previas de nuestro laboratorio muestran que el entrenamiento en la tarea CAS, en la que se adquiere aversión a un sabor novedoso cuando este es asociado con irritación gástrica, bloquea la posibilidad de inducir subsecuente LTP generada ya sea por estimulación de alta frecuencia (Figura 6A), o bien por la administración de la neurotrofina denominada factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en la vía de comunicación que va del núcleo basolateral amigdalino (BLA) a la corteza insular (CI), área neocortical altamente involucrada en los procesos de adquisición y almacenamiento de información espacial y gustativa (Figura 6B) (Rivera-Olvera, Rodríguez-Duran, y Escobar, 2016; Rodríguez-Duran, Castillo, Moguel-Gonzalez y Escobar, 2011; Rodríguez-Duran, Martínez-Moreno y Escobar, 2017).

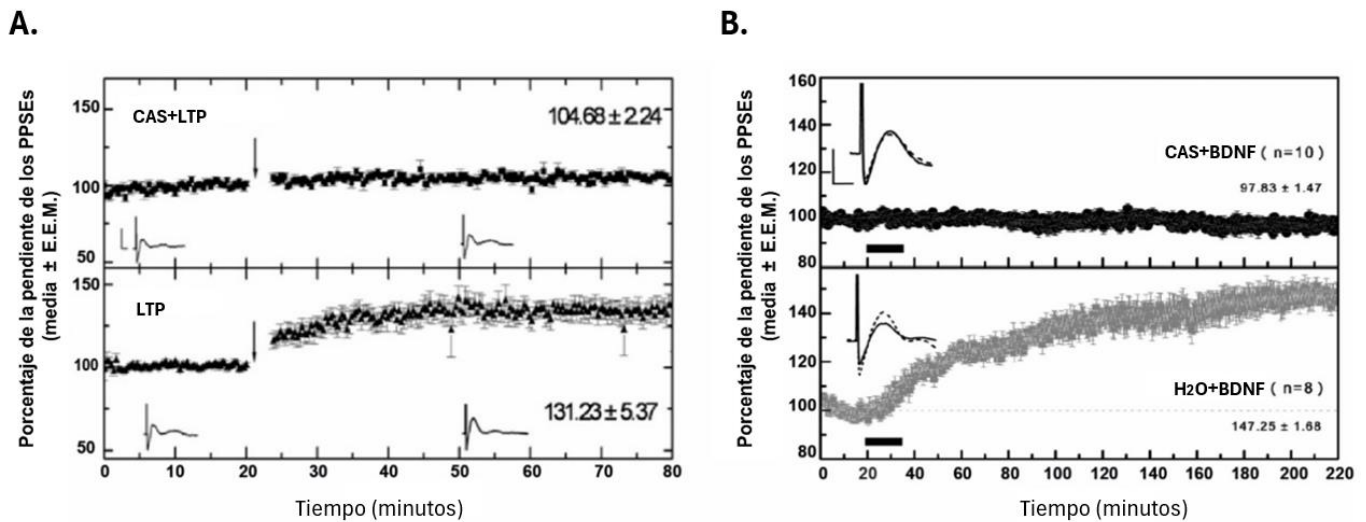


Figura 6. Interacción metaplástica entre el CAS y la LTP inducida en la CI. El entrenamiento en el CAS bloquea la posibilidad de inducir LTP en la vía Bla-CI generada ya sea por estimulación de alta frecuencia (A) o por la administración de BDNF (B). Las gráficas superiores muestran el bloqueo en la inducción de LTP tras el entrenamiento en el CAS. Se observa el porcentaje de los PPSEs con respecto a la línea base. Las flechas indican la aplicación de los trenes de alta frecuencia (A) y las barras negras indican los periodos de administración de BDNF (B). Se muestran trazos representativos y cuantificaciones porcentuales de la pendiente de los potenciales durante la línea base y los últimos 20 min de registro (Modificado de Rodríguez-Durán, Castillo, Moguel-González y Escobar, 2011 y Rivera-Olvera, Rodríguez-Durán y Escobar, 2016).

Asimismo, estudios de nuestro laboratorio han demostrado que la inducción de LTP en la proyección BLA-CI previa al entrenamiento del CAS incrementa la retención de esta tarea (Escobar y Bermudez-Rattoni, 2000), mientras que la inducción de LTD, en esa misma región, facilita su extinción (Rodríguez-Durán et al., 2017). La extinción, se puede definir como una reducción o inhibición temporal de una respuesta condicionada (RC) que tiene lugar una vez establecida una asociación EC-EI (estímulo condicionado-estímulo incondicionado) y el EC es presentado repetidamente en la ausencia del EI (Herry et al., 2010; Myers, Ressler y Davis, 2006).

Ambientes enriquecidos y plasticidad sináptica

Diversos estudios sugieren que la exposición a un AE es capaz de modificar las propiedades electrofisiológicas de las neuronas y que dichos cambios fisiológicos son los causantes de la mejora en la función cognitiva (Eckert y Abraham, 2012; Ohline y Abraham, 2019). Los efectos del ambiente enriquecido sobre la LTP han sido de particular interés, ya que como se mencionó previamente, este fenómeno representa uno de los procesos celulares que subyace a la memoria. En este sentido, se ha demostrado que tras la exposición a un AE durante 10 días es posible restablecer tanto los déficits cognitivos como los de la plasticidad sináptica provocados por un evento de estrés crónico en ratas, facilitando la LTP hipocampal y mejorando la ejecución de los animales en la tarea de laberinto en cruz elevado, reduciendo asimismo su ansiedad (Bhagya et al., 2017). Otra investigación reciente exploró la capacidad del AE para restablecer la actividad en la vía que va del hipocampo ventral a la corteza prefrontal medial implicada en la regulación de las respuestas adaptativas, mostrando que una breve exposición a un AE es capaz de proteger la integridad funcional de esta conexión frente a un evento aversivo (Wu y Mitra, 2021).

Diversos grupos de investigación han demostrado que a pesar de la variación en los diseños experimentales que involucran enriquecimiento ambiental así como a los diferentes grados de exposición a ésta, la circuitería neuronal de los sujetos estudiados es capaz de modificar su transmisión sináptica basal de acuerdo a la respuesta requerida para hacer frente al entorno (Tang et al., 2001; Foster, Gagne, y Massicotte, 1996; Irvine y Abraham, 2005; Ashokan, Hegde, y Mitra, 2016; Ohline y Abraham, 2019). En este sentido, Irvine y Abraham, reportaron que una sola exposición durante la noche (5 p.m. a 9 a.m.) a un ambiente enriquecido incrementa la transmisión sináptica en las colaterales de Schaffer, sugiriendo que el enriquecimiento genera un efecto similar a la LTP que tiene lugar de manera natural en el área CA1 hipocampal (Irvine y Abraham, 2005). Buschler y Manahan-Vaughan por su parte, demostraron que una exposición al AE durante 14 días incrementa la magnitud de la fortaleza sináptica en el área CA1 del hipocampo (Buschler y Manahan-Vaughan, 2012). De manera similar, se ha observado un incremento en la pendiente de los potenciales postsinápticos excitatorios en el área CA3 hipocampal de ratas expuestas durante cinco semanas a enriquecimiento ambiental (Foster y Dumas, 2001).

PLANTEAMIENTO

El enriquecimiento ambiental constituye un paradigma conductual capaz de alterar los microambientes de los organismos, generando respuestas adaptativas para enfrentar situaciones estresantes. Estas modificaciones comprenden desde incrementos en los niveles de ciertos factores tróficos hasta cambios en los niveles de neurotransmisores (Benaroya-Milshtein et al., 2004; Singhal et al., 2014; Zhang et al., 2016; Kempermann, 2019). Estos cambios moleculares son potencialmente capaces de modificar a su vez el desempeño de los individuos en tareas cognitivas, generar reducción de los niveles de estrés, así como modular la eficiencia sináptica de las neuronas (Ickes et al., 2000), por lo que constituirían un importante factor en la regulación homeostática del sistema nervioso. En este orden de ideas, se conoce que el entrenamiento en ciertas tareas conductuales modifica la eficiencia sináptica, como lo demuestran investigaciones de nuestro laboratorio en las que el entrenamiento en el CAS modifica la expresión de LTP en la vía BLA-CI (Rodríguez-Durán, Castillo, Moguel-González, y Escobar, 2011; Rivera-Olvera, Rodríguez-Durán y Escobar, 2016; Rodríguez-Durán, Martínez-Moreno y Escobar, 2017). Considerando los antecedentes expuestos, el presente estudio tiene como finalidad explorar los efectos de la exposición a un ambiente enriquecido sobre la fortaleza de la memoria del CAS, así como sobre la LTP in vivo de la vía que va de la amígdala basolateral a la corteza insular de ratas adultas.

HIPÓTESIS

1. La exposición de ratas adultas a un ambiente enriquecido atenuará la respuesta ante el estímulo aversivo fuerte durante el condicionamiento de aversión a los sabores.
2. La exposición de ratas adultas a un ambiente enriquecido modulará los niveles de BDNF en la corteza insular.
3. La exposición a un ambiente enriquecido modulará la eficiencia sináptica de la vía BLA-CI en ratas adultas.
4. La exposición de ratas adultas a un ambiente enriquecido efectuada entre la sesión de adquisición y la prueba de aversión fortalecerá la memoria del condicionamiento de aversión al sabor a través de mecanismos de etiquetado y marcaje conductual.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos de la exposición a un ambiente enriquecido sobre la fortaleza de la memoria del condicionamiento de aversión al sabor, así como sobre la LTP in vivo de la vía que va de la amígdala basolateral a la corteza insular de ratas adultas.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar los efectos de la exposición a un enriquecimiento ambiental de manera prolongada y breve sobre la memoria del condicionamiento de aversión al sabor.
- Cuantificar los niveles de la neurotrofina BDNF en la CI mediante la técnica de Western Blot.
- Determinar si la exposición a un ambiente enriquecido modifica la potenciación de largo plazo (LTP) in vivo generada por estimulación de alta frecuencia de la vía BLA-CI.
- Evaluar los efectos del enriquecimiento ambiental sobre la fortaleza de la memoria del CAS cuando el AE se presenta entre la sesión de adquisición y la prueba de aversión, en el marco de la hipótesis de etiquetado y marcaje conductual.

MÉTODO

Animales

Para la presente investigación se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, que se mantuvieron en cajas individuales de acrílico, bajo un ciclo de luz oscuridad de 12/12h a una temperatura promedio de 23°C con comida y agua ad libitum (excepto en las fases experimentales en las que se especifique lo contrario). Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-06-ZOO-1999 (SAGARPA, 2001) y con la aprobación del Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Psicología, UNAM.

Entrenamiento en el CAS

Al inicio del entrenamiento en el CAS, los animales fueron privados de agua por 24 horas. Posteriormente, se les entrenó para beber agua dos veces al día (10:00 y 18:00 horas) durante 10 minutos por cada sesión de entrenamiento en un periodo de cuatro días, durante los cuales se establece la línea base de consumo. Para tal fin, se utilizaron probetas graduadas cubiertas con tapones de caucho con boquillas de metal. Durante la adquisición los animales fueron privados de alimento y se sustituyó el agua por el sabor novedoso, que consistió en una solución de sacarina al 0.1% (Sigma, WI; 5.46 mM). Después de 10 minutos de la presentación del estímulo novedoso, se administró una dosis intraperitoneal de cloruro de litio (LiCl) a una concentración de 0.2 M; 9.37 ml/Kg para el caso de un CAS fuerte (CASf) y 0.1 M; 9.37ml/Kg para la obtención de un CAS débil (CASd) para inducir el malestar gástrico. Después de la sesión de adquisición, se restableció el consumo de agua dos veces al día. Finalmente, el día de la prueba de aversión el agua se sustituyó nuevamente por la solución de sacarina 0.1%. La reducción del consumo de sacarina se utilizó para medir la fuerza de la aversión. Para los experimentos que incluyeron la fase de extinción del CAS, los animales tuvieron acceso al consumo de la solución de sacarina a lo largo de nueve sesiones de extinción (uno cada dos días a lo largo de dieciocho días).

Ambiente enriquecido

Para la exposición a un ambiente enriquecido, las ratas se alojaron durante 5 horas diarias por un lapso de siete días o tres semanas (Abraham et al., 2005; Leger et al., 2015; Radabaugh et al., 2016), como se indica en la fase experimental respectiva. El alojamiento consistió en una caja de plástico oscuro de grandes dimensiones (93.3 x 54.3 x 45.7cm), cubierta con una cama de aserrín que contenía objetos con diferentes texturas y colores, túneles, resbaladilla, así como una rueda de ejercicio y con el fin de mejorar la estimulación cognitiva en los animales y proveer novedad (Sztainberg y Chen, 2010) los objetos se situaron en un orden diferente cada dos días. Además, con el fin de fomentar la interacción social, los animales se mantuvieron en grupos de 6 sujetos.

Registro electrofisiológico *in vivo*

Tras 48 horas de concluida la fase conductual los grupos experimentales fueron sometidos a cirugía (Rodríguez-Duran et al., 2011; Rodríguez-Duran y Escobar, 2014). Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital (50mg/kg i.p.), posteriormente se dieron inyecciones suplementarias del anestésico a intervalos de una hora con el fin de mantener los niveles quirúrgicos de anestesia. Las respuestas en la corteza insular fueron registradas unilateralmente con un electrodo monopolar de acero de 0.005 pulgadas de diámetro. Las respuestas fueron evocadas unilateralmente a través de estimulación directa en el núcleo basolateral amigdalino. La estimulación (pulsos monofásicos de 20-40 μ A y 0.1-0.25 msec de duración) fue suministrada por un estimulador Grass S48. Las respuestas evocadas fueron registradas y amplificadas para su posterior análisis en una computadora provista del software Data Wave. Estímulos de baja frecuencia fueron administrados cada 20 segundos durante los 20 minutos que constituyen la línea base del registro. Las señales electroencefalográficas fueron monitoreadas durante todo el registro. Para inducir el fenómeno de LTP, se aplicaron 10 trenes de estimulación con duración de un segundo a una frecuencia de 100 Hz, con un intervalo intertrén de 20 segundos. Tras la estimulación de alta frecuencia, las respuestas evocadas fueron registradas durante dos horas más, con el fin de observar los cambios en los potenciales postsinápticos excitatorios.

Curvas entrada-salida (I/O)

Con el propósito de determinar la eficiencia sináptica para un rango determinado de intensidades de estimulación, se midió la relación entre la entrada de corriente y la salida de voltaje (I/O) en la vía BLA-CI utilizando múltiplos de una intensidad basal (1x-10x). La intensidad basal se determinó como la estimulación necesaria para evocar una respuesta de 10 mV (Rodríguez-Durán et al., 2011).

Tinción de Nissl

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

Western Blot

Con el fin de analizar los niveles de BDNF en la CI, se realizó la eutanasia de los animales para la obtención del cerebro y toma de muestra de la corteza insular de manera bilateral. Los tejidos fueron sonicados en un buffer de lisis (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 20 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10% glycerol, 10% tritón) suplementado con inhibidores de proteasa 10 mM (MiniComplete, Roche, Mannheim, Alemania). Las muestras fueron centrifugadas a 13 000 rpm durante 30 min a 4°C y se rescató el sobrenadante. La concentración de proteínas se midió usando el ensayo de Bradford, con una curva estándar de albumina de suero bovino. Una cantidad equivalente de proteína para cada muestra se corrió en geles de SDS-acrilamida al 15%. Cada gel se transfirió en una membrana de nitrocelulosa y se bloqueó con una solución de leche al 5% en TBS- Tween. Las membranas se incubaron con anticuerpo Anti-BDNF (1:1000, Abcam, EE. UU) para la detección de la proteína BDNF. Finalmente, las bandas de proteínas se

visualizaron con un anticuerpo secundario acoplado a HRP (peroxidasa de rábano), utilizando el sistema ECL prime Western (GE Healthcare Bio-Science, Pittsburgh, PA). Se capturaron las imágenes y se analizó por densitometría a través del software Image J (Gutiérrez-Vera et al., 2022).

Análisis de datos

El análisis de datos se llevó a cabo con el software GraphPad Prism, versión 8.0. El análisis de los datos generados durante los experimentos conductuales se efectuó mediante un ANOVA de dos vías (factores: condición y sesión). En cuanto a los experimentos electrofisiológicos, se aplicó un ANOVA de medidas repetidas, mientras que los resultados de los inmunoblots se analizaron mediante ANOVA de dos vías. Posteriormente, para todos los análisis, se realizaron pruebas post-hoc utilizando la prueba de LSD de Fisher o el método de Bonferroni. Los datos se representan gráficamente como la media \pm el error estándar (EEM).

Fases experimentales

Con el propósito de alcanzar los objetivos planteados, el presente proyecto consta de las siguientes fases experimentales.

Fase experimental I

Para evaluar el efecto de la exposición a un AE sobre la fortaleza de la memoria del CAS, así como analizar la participación de la neurotrofina BDNF en la interacción AE-CAS, los animales se dividieron en los siguientes grupos experimentales:

- Grupo CASd (n=16): Los animales fueron entrenados en el CAS y durante la sesión de adquisición recibieron una dosis i.p. de LiCl a una concentración 0.1 M; 9.37 ml/Kg, a fin de inducir una aversión débil (Martínez-Moreno et al., 2016). Tras 48h de haber finalizado el entrenamiento, a través de eutanasia de los animales se obtuvo la CI para la cuantificación de los niveles de BDNF mediante la técnica de Western Blot (Rivera-Olvera et al., 2016; Rodríguez-Duran et al., 2011).

- Grupo CASf (n=16): Los animales fueron entrenados en el CAS, y durante la sesión de adquisición recibieron una dosis i.p. de LiCl a una concentración 0.2 M; 9.37 ml/Kg, a fin de inducir una aversión fuerte (Martínez-Moreno et al., 2016).

Tras 48h de finalizado el entrenamiento, a través de eutanasia de los animales se obtuvo la CI para la cuantificación de los niveles de BDNF mediante la técnica de Western Blot (Rivera-Olvera et al., 2016; Rodríguez-Duran et al., 2011).

- Grupo AE+CASd (n=16): Los animales fueron expuestos a un ambiente enriquecido por 21 días por 5 horas diarias (Leger et al., 2015). Una vez finalizada la exposición al AE, los animales fueron entrenados en el CAS y durante la sesión de adquisición recibieron una dosis i.p. de LiCl a una concentración 0.1 M; 9.37 ml/Kg, a fin de inducir una aversión débil (Martínez-Moreno et al., 2016). Finalmente, 48h después de la prueba de aversión, se realizó la eutanasia de los animales obteniendo la CI para la cuantificación de los niveles de BDNF mediante la técnica de Western Blot (Rivera-Olvera et al., 2016; Rodríguez-Duran et al., 2011).

- Grupo AE+CASf (n=12): Los animales fueron expuestos a un ambiente enriquecido por 21 días por 5 horas diarias (Leger et al., 2015). Una vez finalizada la exposición al AE, los animales fueron entrenados en el CAS y durante la sesión de adquisición recibieron una dosis i.p. de LiCl a una concentración 0.2 M; 9.37 ml/Kg, a fin de inducir una aversión fuerte (Martínez-Moreno et al., 2016). Finalmente, 48h después de la prueba de aversión, se realizó la eutanasia de los animales obteniendo la CI para la cuantificación de los niveles de BDNF mediante la técnica de Western Blot (Rivera-Olvera et al., 2016; Rodríguez-Duran et al., 2011).

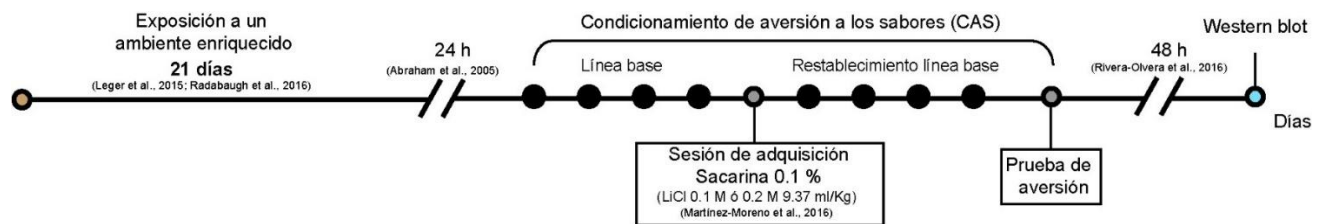


Figura 7. Diagrama del procedimiento experimental correspondiente a la fase I. Se llevó a cabo la exposición de los animales a un ambiente enriquecido por 21 días seguida del entrenamiento en el condicionamiento de aversión al sabor. Finalmente 48 horas después se realizó la eutanasia de los animales para obtener la corteza insular y medir los niveles de BDNF mediante la técnica de Western Blot.

Fase experimental II

Una vez exploradas las modificaciones generadas por la exposición a enriquecimiento ambiental durante 21 días, nos preguntamos si era posible atenuar la respuesta de aversión del CAS reduciendo la exposición temporal a un AE por 7 días. En este contexto, un estudio de Abraham y colaboradores muestra que a partir de 7 días de exposición a un ambiente enriquecido es posible promover modificaciones en la comunicación sináptica que afectan la respuesta requerida para hacer frente al entorno (Abraham et al., 2005). Asimismo, con el propósito de conocer los efectos del AE sobre la expresión de la plasticidad sináptica (LTP) de la vía BLA-CI *in vivo*, empleamos los grupos que se describen a continuación:

- Grupo CASd (n=10): Los animales fueron entrenados en el CAS y durante la sesión de adquisición recibieron una dosis i.p. de LiCl a una concentración 0.1 M; 9.37 ml/Kg, a fin de inducir una aversión débil (Martínez-Moreno et al., 2016; Rivera-Olvera et al., 2016).

- Grupo CASf (n=10): Los animales fueron entrenados en el CAS, y durante la sesión de adquisición recibieron una dosis i.p. de LiCl a una concentración 0.2 M; 9.37 ml/Kg, a fin de inducir una aversión fuerte (Martínez-Moreno et al., 2016; Rivera-Olvera et al., 2016).

- Grupo AE7+CASf (n=9): El cual fue expuesto durante siete días a un AE (Abraham et al., 2005), tras 24 h de haber finalizado la exposición (Abraham et al., 2005; Leger et al., 2015) los animales fueron entrenados en el CAS, y durante la sesión de adquisición recibieron una dosis i.p. de LiCl a una concentración 0.2 M; 9.37 ml/Kg, a fin de inducir una aversión fuerte (Martínez-Moreno et al., 2016; Rivera-Olvera et al., 2016).

- Grupo LTP (n=6): Los animales fueron sometidos a la inducción de LTP en la vía BLA-CI de acuerdo con los protocolos descritos previamente por nuestro grupo de investigación (Rivera-Olvera et al., 2016; Rodríguez-Duran et al., 2011).

- Grupo AE7+LTP (n=7): El cual fue expuesto durante siete días a un AE (Abraham et al., 2005), tras 24 h de haber finalizado la exposición (Abraham et al., 2005; Leger et al., 2015) se sometió al protocolo electrofisiológico para generar una LTP en la vía BLA-CI (Rivera-Olvera et al., 2016).

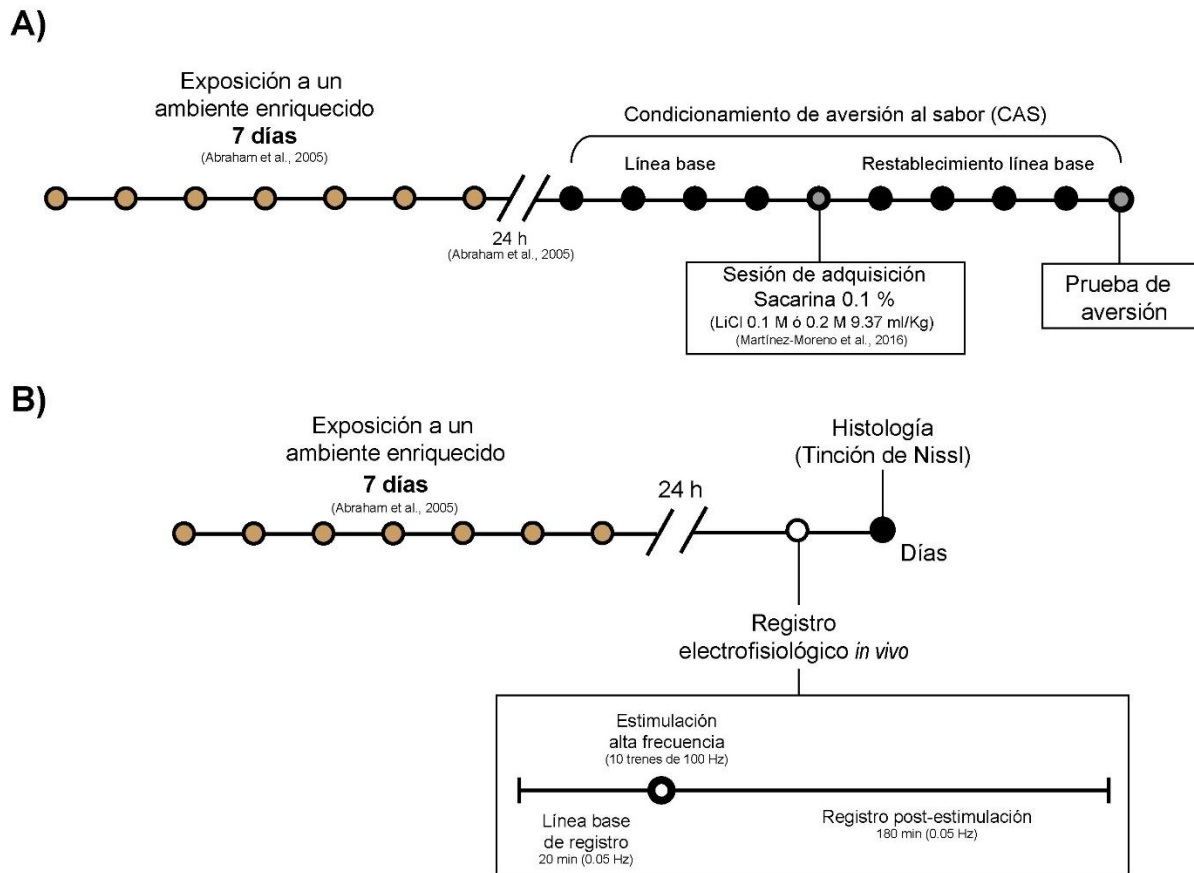


Figura 8. Diagramas del procedimiento experimental correspondiente a la fase II. A) Se llevó a cabo la exposición durante siete días a un ambiente enriquecido, seguida del entrenamiento en el condicionamiento de aversión al sabor. **B)** Tras 24 horas de efectuada la exposición a un ambiente enriquecido durante siete días, se realizó el registro electrofisiológico *in vivo* a fin de inducir LTP en la vía BLA-Cl mediante estimulación de alta frecuencia.

Fase experimental III

Los cambios duraderos en la fortaleza de la comunicación sináptica y la persistencia de las memorias no están exclusivamente vinculados a las características inherentes de los estímulos que provocan dichas transformaciones. Tanto los eventos o experiencias novedosas que acontecen antes o después de dichos estímulos pueden ejercer una notable influencia sobre la plasticidad sináptica y el mantenimiento de la memoria (Okuda et al., 2021; Ibrahim, Benoy y Sajikumar, 2022). En este contexto exploramos la hipótesis de etiquetado y marcaje conductual, evaluando los efectos del enriquecimiento ambiental sobre la fortaleza de la memoria del CAS, cuando el AE se presenta entre la sesión de adquisición y la prueba de aversión. Con este fin empleamos los grupos que se describen a continuación:

- Grupo CASf (n=12): El cual recibió un tratamiento similar al grupo CASf descrito en las fases anteriores.
- Grupo CASd (n=12): El cual recibió un tratamiento similar al grupo CASd descrito en las fases anteriores.
- Grupo CASfAE (n=12): En el cual los animales fueron entrenados en el CAS, y durante la sesión de adquisición recibieron una dosis i.p. de LiCl a una concentración 0.2 M; 9.37 ml/Kg, a fin de inducir una aversión fuerte. Una hora después (Moncada et al., 2015) de la sesión de adquisición los animales fueron expuestos a un AE durante siete días (Abraham et al., 2005), y tras 15 hr de finalizada la exposición al AE (Leger et al., 2015) se llevó a cabo la prueba de aversión (Rivera-Olvera et al., 2016).
- Grupo CASfCH (n=11): El cual recibió un tratamiento similar al grupo CASfAE, exceptuando la exposición a enriquecimiento ambiental. Durante la ventana temporal de siete días entre la sesión de adquisición y la prueba de aversión, este grupo permaneció en restablecimiento de línea base en condiciones estándar en sus respectivas cajas habitación.
- Grupo CASdAE (n=11): En el cual los animales fueron entrenados en el CAS, y durante la sesión de adquisición recibieron una dosis i.p. de LiCl a una concentración 0.1 M; 9.37 ml/Kg, a fin de inducir una aversión débil. Una hora después (Moncada et al., 2015) de la sesión de adquisición los animales fueron expuestos a un AE durante siete días (Abraham et al., 2005), y tras 15 hr de finalizada la exposición al AE (Leger et al., 2015) se llevó a cabo la prueba de aversión (Rivera-Olvera et al., 2016).

- Grupo CASdCH (n=12): El cual recibió un tratamiento similar al grupo CASdAE, exceptuando la exposición a enriquecimiento ambiental. Durante la ventana temporal de siete días entre la sesión de adquisición y la prueba de aversión, este grupo permaneció en restablecimiento de línea base en condiciones estándar en sus respectivas cajas habitación.

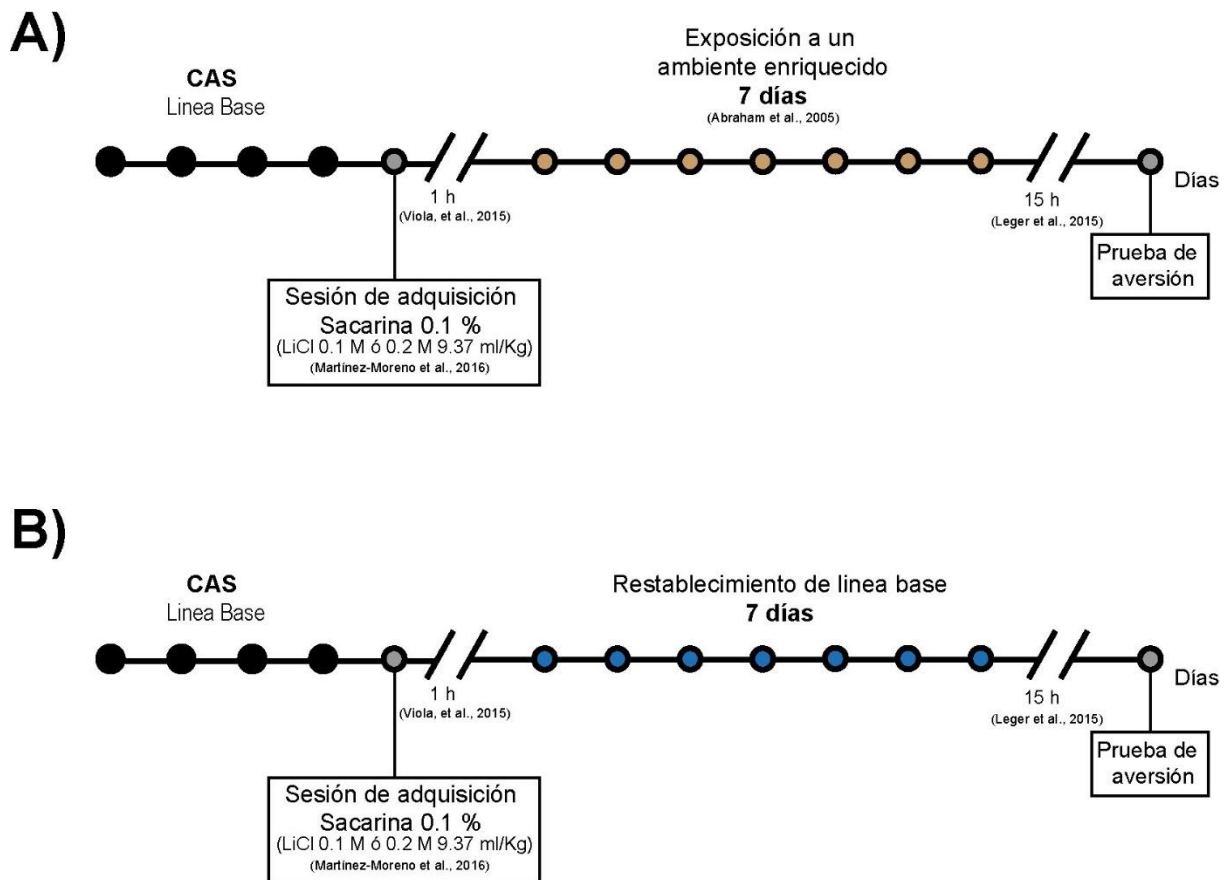


Figura 9. Diagramas del procedimiento experimental correspondiente a la fase III. Una hora después de finalizada la sesión de adquisición del CAS, en la cual se efectúa la asociación del estímulo novedoso con el malestar gástrico, los animales son expuestos a enriquecimiento ambiental durante siete días (A) o bien permanecen en restablecimiento de la línea base (B). Finalmente 15 horas más tarde se lleva a cabo la correspondiente prueba de aversión.

RESULTADOS

FASE EXPERIMENTAL I

La exposición a un ambiente enriquecido durante 21 días atenúa la aversión del condicionamiento de aversión a los sabores

Los diferentes grupos experimentales no presentaron diferencias significativas en la ingesta de sacarina durante la sesión de adquisición. Por el contrario, durante la prueba de aversión, el ANOVA de dos vías reveló diferencias significativas entre los grupos entrenados en CASd y CASf ($F_{1,56} = 36.13$ $p < 0.001$), en concordancia con lo reportado previamente por nuestro laboratorio (Martínez-Moreno et al., 2016). De manera interesante, los grupos AE+CASf y CASf presentaron diferencias significativas entre sí ($p < 0.001$, Figura 10), demostrando que la exposición a un ambiente enriquecido durante 21 días es capaz de atenuar una memoria aversiva fuerte. Por su parte, no se observaron diferencias significativas entre los grupos AE+CASd y CASd, mostrando que el ambiente enriquecido bajo las condiciones empleadas en el presente estudio no modifica una memoria aversiva débil (Figura10).

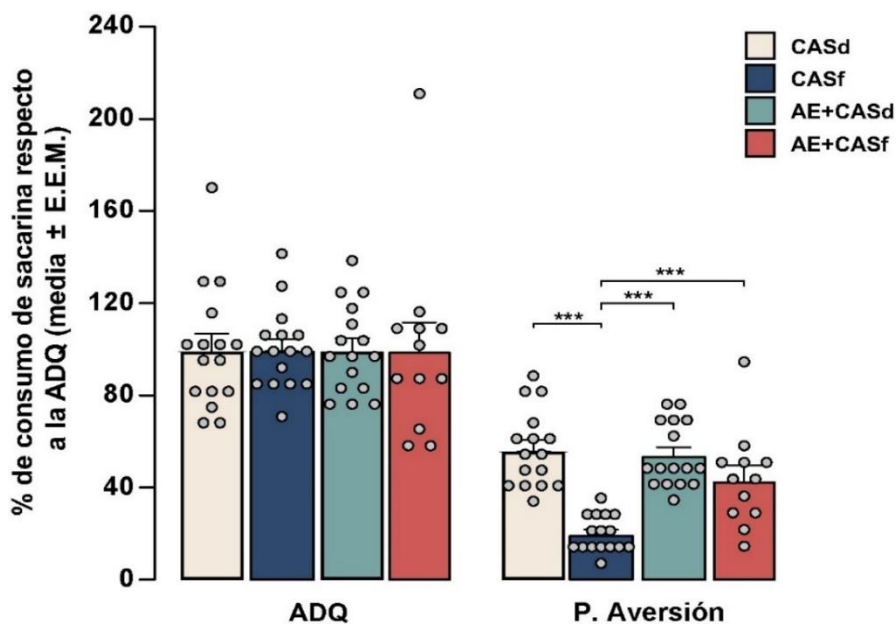


Figura 10. El ambiente enriquecido atenúa la aversión en el condicionamiento de aversión a los sabores. Porcentaje del consumo de sacarina respecto a la sesión de adquisición para los grupos CASf (n=16), CASd (n=16), AE+CASf (n=12) y AE+CASd (n=16). Nótese que el ambiente enriquecido es capaz de mitigar una respuesta aversiva fuerte, sin embargo, no modifica la respuesta aversiva débil. ADQ: sesión de adquisición; P. Aversión: prueba de aversión Las barras representan media \pm E.E.M. *** $P < 0.001$.

La interacción AE-CAS restaura los niveles de BDNF en la corteza insular

Se ha descrito a la neurotrofina BDNF como una de las principales proteínas sintetizadas como resultado de una exposición de los animales a un ambiente enriquecido (Rossi et al., 2006; Sun et al., 2010). En este sentido, estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que la infusión de BDNF en la CI es capaz de convertir un CAS débil en uno fuerte (Martínez-Moreno et al., 2016) además de favorecer su retención (Castillo, Figueroa-Guzman, y Escobar, 2006). Por tal motivo evaluamos los niveles de esta neurotrofina en la corteza insular para la identificación de la interacción resultante AE+CAS. El análisis de Western Blot mostró que el CAS fuerte produce una disminución de los niveles de BDNF medidos 48 horas después de la prueba de aversión en comparación con el resto de los grupos (ANOVA de dos vías $F_{2,19} = 4.99$; $p < 0.01$), en tanto que el grupo sometido a enriquecimiento ambiental que recibió el mismo condicionamiento de aversión (AE+CASf), mantuvo niveles similares de esta neurotrofina respecto al grupo intacto (INT) (ANOVA de dos vías $F_{1,19} = 4.641$; $p = 0.3$) (Figura 11A). Los grupos CASd y AE+CASd no mostraron diferencias significativas entre sí ni respecto al grupo intacto ($p > 0.05$). Para evaluar la relación entre los niveles de BDNF y la atenuación en la memoria del CAS inducida por la exposición al AE realizamos un análisis de regresión lineal (Figura 11B), mostrando que existe una relación positiva entre los niveles de BDNF y los niveles de consumo de sacarina ($r^2=0.85$). Esto demuestra que el decremento en los niveles de BDNF en la CI correlaciona con el decremento en el consumo de sacarina del grupo CASf durante la prueba de aversión. En tanto que el incremento en el consumo de sacarina observado en el grupo AE+CASf tras la exposición al AE correlaciona con la restauración de los niveles de BDNF en este grupo. Confirmando que el ambiente enriquecido es capaz de atenuar una memoria aversiva fuerte restaurando los niveles de BDNF en la corteza insular.

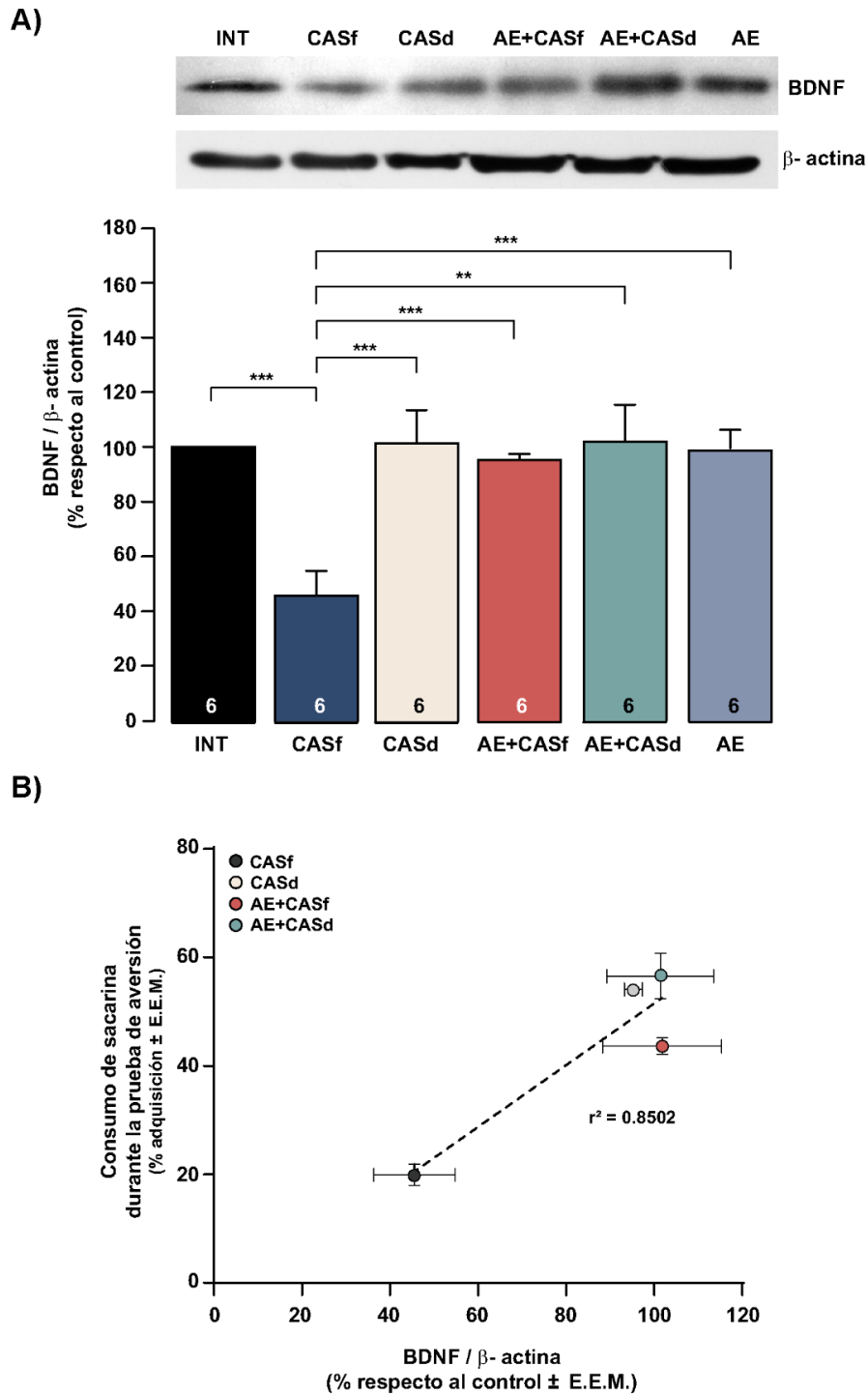


Figura 11. La interacción AE-CAS restaura los niveles de BDNF en la corteza insular. (A) Western Blot representativo de la proteína BDNF (panel superior) y su análisis por densitometría en los grupos INT, CASf, CASd, AE+CASf, AE+CASd y AE (panel inferior). **(B)** Regresión lineal entre los niveles de consumo de sacarina y los niveles de BDNF para los grupos: CASf, CASd, AE+CASf y AE+CASd. La regresión lineal muestra un decremento en los niveles de BDNF relacionados al decremento en el consumo de sacarina en el grupo CASf. Mientras que el incremento en el consumo de sacarina observado en el grupo AE+CASf correlaciona con la restauración de los niveles de BDNF. Las barras representan media \pm E.E.M. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

FASE EXPERIMENTAL II

La exposición a un AE durante siete días reduce la aversión en el CAS

Con el fin de evaluar si una exposición breve a un AE es capaz de favorecer una respuesta resiliente en los animales (Leger et al., 2015; Koe, Ashokan y Mitra, 2016; Bhagya et al., 2017; Cavalcante et al., 2020), determinamos el efecto de una exposición a un AE de siete días sobre la fortaleza de la aversión en la tarea del CAS. Nuestros resultados muestran que no existen diferencias significativas entre los grupos durante la sesión de adquisición del CAS. Por el contrario, durante la prueba de aversión el ANOVA de dos vías muestra diferencias significativas entre los grupos ($F_{2,52} = 8.216$ $p < 0.001$). De manera notable, la prueba post-hoc de Bonferroni mostró diferencias significativas entre los grupos AE+CASf y CASf ($p < 0.001$, Figura 12), demostrando que la exposición a un ambiente enriquecido durante 7 días es capaz de atenuar una memoria aversiva fuerte, de manera similar a la obtenida tras la exposición de 21 días (Figura 10). Por su parte, no se observaron diferencias significativas entre los grupos AE+CASd y CASd ($p = 0.8478$), mostrando que el ambiente enriquecido bajo las condiciones empleadas en esta fase experimental no modifica una memoria aversiva débil (Figura 12).

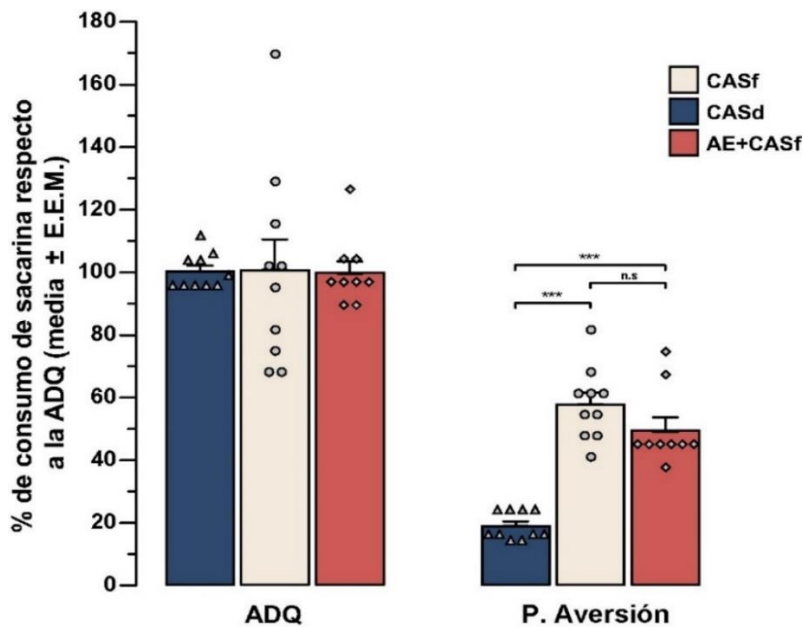


Figura 12. Una breve exposición al enriquecimiento ambiental atenúa una aversión fuerte. Las barras representan el porcentaje del consumo de sacarina respecto a la sesión de adquisición para los grupos CASf (n=10), CASd (n=10) y AE7+CASf (n=9). Se representan con triángulos, círculos y rombos los valores individuales. Nótese que una breve exposición a un AE es capaz de reducir la una respuesta aversiva fuerte. ADQ: sesión de adquisición; P. Aversión: prueba de aversión. *** $p < 0.001$.

De igual modo, logramos observar que los grupos AE7+CASf, AE21+CASf no presentan diferencias significativas entre sí ($p=0.9301$), indicando que la exposición durante siete días a un AE es suficiente para atenuar la fuerte aversión del CAS. Estos resultados demuestran la capacidad del ambiente enriquecido para modular el impacto fisiológico del estímulo aversivo (Figura 13).

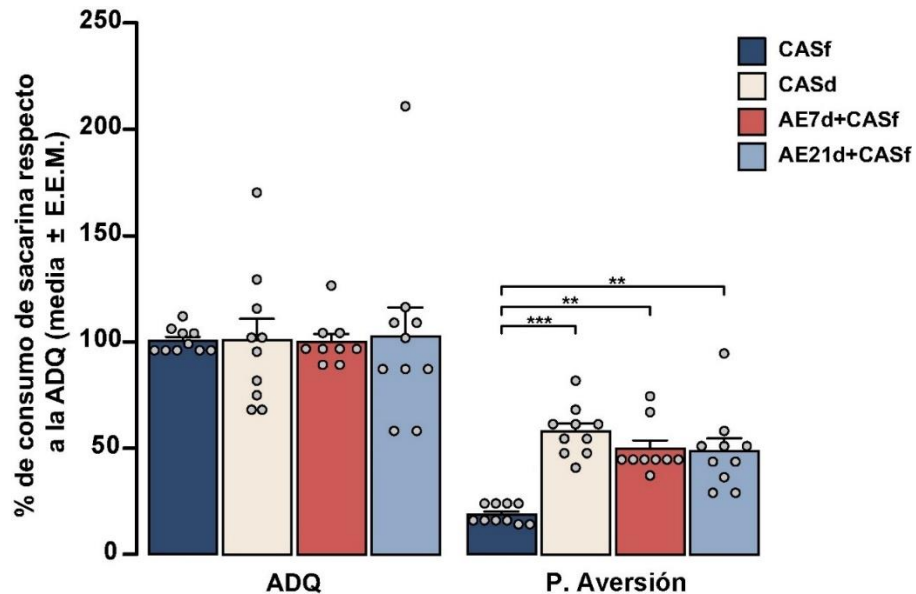


Figura 13. La exposición al AE durante 7 y 21 días atenúa de manera similar la aversión en el condicionamiento de aversión a los sabores. Las barras representan el promedio del porcentaje de consumo de sacarina respecto a la sesión de adquisición para los grupos CASf ($n=10$), CASd ($n=10$), AE7+CASf (AE por 7 días) ($n=9$) y AE21+CASf (AE por 21 días) ($n=12$). Se representan con triángulos, círculos y rombos los valores individuales. Nótese que la exposición a un ambiente enriquecido durante 7 y 21 días es capaz de mitigar una respuesta aversiva fuerte. ADQ: sesión de adquisición; P. Aversión: prueba de aversión. Las barras representan media \pm E.E.M. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

La exposición a un ambiente enriquecido durante siete días previene el mantenimiento de la LTP in vivo de la vía que va del núcleo basolateral amigdalino a la corteza insular

Estudios previos de nuestro laboratorio demuestran que el entrenamiento en el CAS bloquea la capacidad de inducir una posterior LTP en la vía BLA-CI generada por la administración de BDNF o estimulación de alta frecuencia (Rivera-Olvera et al., 2016, Rodríguez-Durán y Escobar, 2014). Asimismo, se ha demostrado que a pesar de la variación en los diseños experimentales con enriquecimiento y el tiempo de exposición a éste, los circuitos neuronales son capaces de modificar su transmisión sináptica de acuerdo con la respuesta requerida para hacer frente al entorno (Foster et al.,

1996; Tang et al., 2001; Irvine y Abraham, 2005; Ashokan et al., 2016; Ohline y Abraham, 2019) Considerando lo anterior, el propósito de esta fase desarrollada durante el presente semestre fue determinar si la exposición a un ambiente enriquecido modifica la LTP *in vivo* generada por estimulación de alta frecuencia de la vía BLA–CI, altamente involucrada en el procesamiento de la memoria del condicionamiento de aversión al sabor.

La respuesta característica de esta señal, la cual fue inducida por pulsos monofásicos de 50-70 μA y 0.25 ms de duración, inició de 2 a 3 ms y presentó su cresta a los 7-9 ms aproximadamente. La amplitud promedio de los potenciales de campo fue de 0.34 ± 0.04 mV, con una pendiente de 0.15 ± 0.02 . La LTP presentó un incremento post-tetánico, característico de la LTP dependiente del receptor NMDA, tanto en la amplitud como en la pendiente de los EPSP's, en concordancia con nuestros estudios previos (Rivera-Olvera et al., 2018; Rodríguez-Durán et al., 2017). El ANOVA de medidas repetidas de la pendiente de los potenciales postsinápticos excitatorios reveló diferencias significativas entre los grupos ($F_{1,11}=7.82$; $p = 0.017$). De manera interesante en el grupo AE+LTP es posible inducir la LTP, aunque su duración se ve claramente afectada mostrando un decaimiento aproximadamente 70 minutos después de iniciado el fenómeno (Figura 14C). La prueba post-hoc de Fisher muestra diferencias significativas entre el grupo LTP y el grupo AE+LTP al comparar los últimos 20 minutos de registro ($p < 0.05$). Estos resultados muestran que la exposición a un ambiente enriquecido durante siete días es capaz de afectar el mantenimiento de la LTP *in vivo* de la vía que va del núcleo basolateral amigdalino a la corteza insular. Por su parte, el análisis de las curvas I/O mostró que la exposición breve a un ambiente enriquecido disminuye la excitabilidad basal de la vía BLA-CI. El análisis de regresión no lineal de las curvas I/O (Rodríguez-Durán et al., 2011; Moreno-Castilla et al., 2016), mostró diferencias significativas entre los grupos AE+LTP y LTP ($p < 0.05$) indicando que la exposición al AE disminuye la eficiencia de la comunicación sináptica basal en la proyección BLA-CI (Figura 14B).

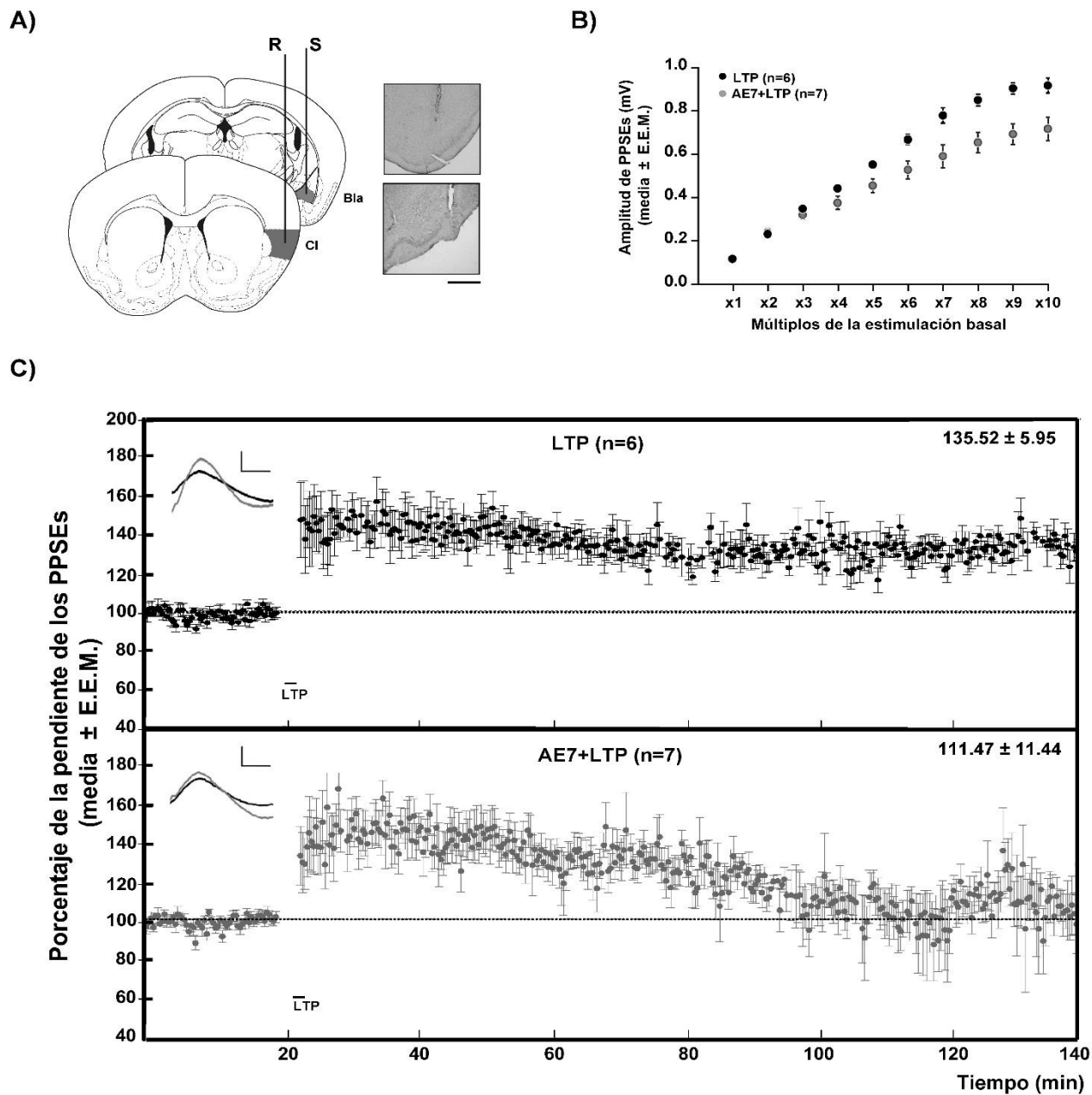


Figura 14. La exposición a EA durante 7 días previene el mantenimiento de LTP en la corteza insular in vivo. (A) Representación esquemática e imágenes representativas de los sitios de estimulación (S) y de registro (R) en un corte coronal. BLA: amígdala basolateral; CI: corteza insular. Escala 1 mm. **(B)** Representación de la media de la curva I/O para los grupos LTP y AE7+LTP. **(C)** Respuesta evocada en la corteza insular en los grupos LTP (panel superior) y AE+LTP (panel inferior). Se muestran trazos representativos previos (negro) y posteriores (gris) a la estimulación de alta frecuencia. Los números superiores a la derecha muestran el promedio del porcentaje de la pendiente de los EPSPs (porcentaje respecto a línea base) durante los últimos 20 minutos de registro. Obsérvese que la exposición por 7 días a un ambiente enriquecido previene el mantenimiento de LTP en la corteza insular (Barra de escala: 10 ms, 0.5 mV).

FASE EXPERIMENTAL III

La exposición a un AE efectuada entre la sesión de adquisición y la prueba fortalece la aversión de un CAS débil

La hipótesis de BT ha establecido una base sólida en la comprensión de como nuevas experiencias, especialmente aquellas altamente relevantes para los organismos, pueden modular la formación y consolidación de la memoria de largo plazo (Davis et al., 2004; Viola et al., 2014; Moncada et al., 2015), particularmente cuando la intervención se efectúa entre la fase de adquisición y la prueba de aversión. En este orden de ideas en esta fase evaluamos los efectos del enriquecimiento ambiental sobre la fortaleza de la memoria del CAS cuando el AE se presenta entre la sesión de adquisición y la prueba de aversión, en el marco de la hipótesis de etiquetado y marcaje conductual.

Los diferentes grupos experimentales no presentaron diferencias significativas en la ingesta de sacarina durante la sesión de adquisición. Por el contrario, durante la prueba de aversión el ANOVA de dos vías mostró diferencias significativas entre los grupos ($F_{5,128} = 50.47$ $p = 0.0001$). La prueba post-hoc de Bonferroni mostró diferencias significativas entre los grupos control CASf y CASd ($p < 0.0001$) en concordancia con lo reportado previamente por nuestro laboratorio (Gutiérrez-Vera et al., 2022), así como entre los grupos control CASfCH y CASdCH ($p < 0.0001$). De manera interesante, el grupo CASdAE presentó diferencias significativas respecto a los grupos CASd y CASdCH ($p < 0.0001$), mostrando por vez primera, que una breve exposición en un entorno enriquecido es capaz de fortalecer significativamente la respuesta aversiva débil del CAS. Estos resultados apoyan la hipótesis de que las experiencias novedosas proporcionan PRPs que pueden ser capturados por las etiquetas de aprendizaje inducidas por entrenamientos débiles para permitir el mantenimiento de las memorias de largo plazo (Figura 15).

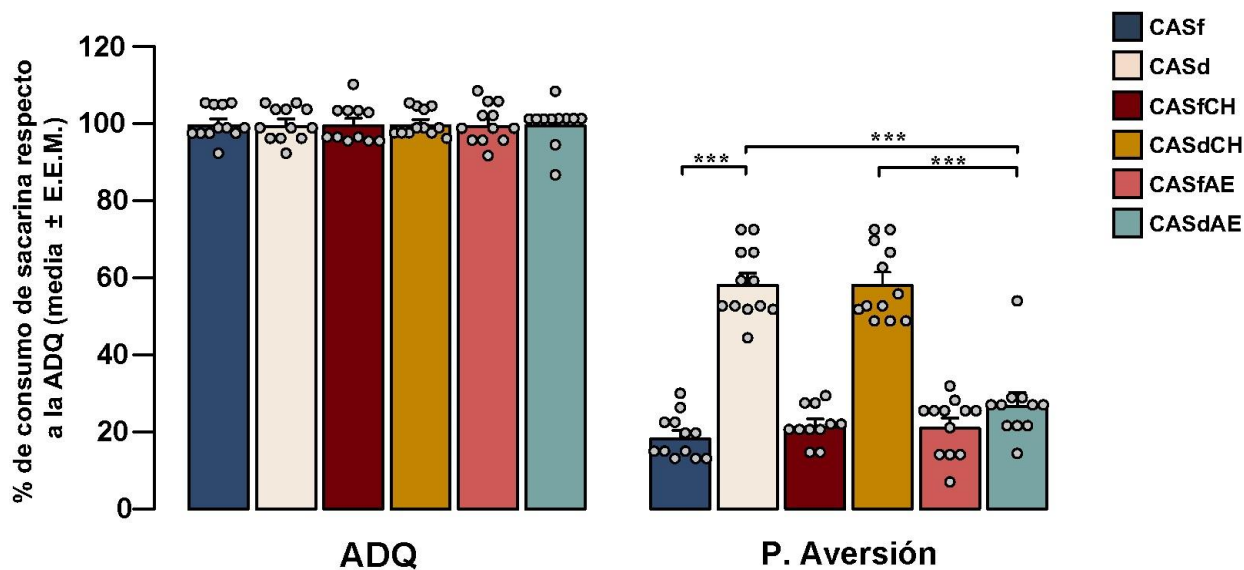


Figura 15. La exposición al AE efectuada entre la sesión de adquisición y la prueba de aversión del CAS fortalece una memoria aversiva débil. Porcentaje del consumo de sacarina respecto a la sesión de adquisición para los grupos CASf (n=12), CASd (n=12), CASfCH (n=11) y CASdCH (n=12), CASfAE (n=12), CASdAE (n=11). Se representan con triángulos, círculos y rombos los valores individuales. Nótese que la exposición a un ambiente enriquecido una hora después de la sesión de adquisición incrementa la aversión en los animales del grupo CASdAE. ADQ: sesión de adquisición; P. Aversión: prueba de aversión. Las barras representan la media ± E.E.M. *** P < 0.001.

DISCUSIÓN

El AE atenúa la aversión en el CAS

Se ha demostrado que el ambiente enriquecido induce efectos neuroprotectores y reduce las conductas desadaptativas provocadas por diversos factores estresantes (Hegde, Suresh, y Mitra, 2020; Kentner, Lambert, Hannan, Donaldson, 2019; Lehmann y Herkenham, 2011). Gran parte de estas investigaciones se han centrado en la formación hipocampal (Bayne, 2018; Kempermann, 2019; Ohline y Abraham, 2019).

Los resultados del presente estudio demuestran que la exposición a un ambiente enriquecido es capaz de atenuar la respuesta de aversión ante un estímulo aversivo robusto. Estos hallazgos son consistentes con la literatura en la que se ha descrito que el ambiente enriquecido modula el desempeño de los individuos en tareas cognitivas reduciendo los niveles de estrés (Ickes et al., 2000; Lehmann y Herkenham, 2011). Se ha propuesto que el ambiente enriquecido promueve actitudes adaptativas, así como el desarrollo de resiliencia ante situaciones estresantes (Smail et al., 2020).

Actualmente se considera que los efectos benéficos o neuroprotectores en animales expuestos a ambientes enriquecidos se magnifican revirtiendo los efectos perjudiciales del estrés cuando los estresores aplicados son intensos (Shilpa et al., 2017; Novaes et al., 2018; Shen et al., 2019) en concordancia con los hallazgos del presente estudio. En contraste, los animales que tuvieron un entrenamiento débil en el CAS no mostraron disminución de la fuerza de aversión tras la exposición a un ambiente enriquecido. En este sentido se ha descrito que en paradigmas conductuales en los que los estresores son débiles, el enriquecimiento ambiental puede no ejercer efectos aparentes, probablemente este fenómeno se deba a que el enriquecimiento aumenta la capacidad de resistir la exposición repetida a tensiones muy leves manteniendo al sistema estable (Crofton et al., 2015; Smail et al., 2020).

En consonancia con lo anterior, se ha sugerido que el enriquecimiento ambiental podría operar mediante un mecanismo de habituación al estrés, en el cual mediante exposiciones repetidas a un estresor puede disminuir las respuestas aversivas, y a su vez, fortalecer la resiliencia ante futuros

estresores (Smail et al., 2020). De hecho, durante el período de enriquecimiento, los animales están expuestos repetidamente a objetos novedosos, y esto podría ser comparable a eventos repetidos de estrés leve. Dado que ninguno de estos eventos tiene un resultado aversivo, los animales podrían ser preparados para la subsecuente exploración del entorno desconocido, incluyendo objetos e interacciones sociales, promoviendo así un comportamiento emocionalmente estable (Larsson, Winblad y Mohammed, 2002).

La interacción AE-CAS restaura los niveles de BDNF en la CI

De acuerdo con nuestros resultados, la atenuación del CAS robusto originada por la exposición a enriquecimiento ambiental se relaciona con el restablecimiento de los niveles de BDNF en la corteza insular. Efectos similares han sido descritos en ratas estresadas expuestas a enriquecimiento ambiental que mejoraron el rendimiento en tareas de aprendizaje espacial, memoria y a su vez redujeron conductas depresivas y ansiosas donde esta modulación positiva en los animales se relacionó con un aumento en los niveles de BDNF, VEGF y GFAP en el hipocampo (Shilpa et al., 2017).

Numerosos estudios han descrito la relevancia del BDNF en los mecanismos de aprendizaje y memoria, así como en la regulación de la plasticidad sináptica (Brigadski y Leßmann, 2014; Cunha, Brambilla, y Thomas, 2010; Kowianski et al., 2018). Esta neurotrofina es capaz de regular la eficiencia de la comunicación sináptica, modulando la expresión tanto de LTP como de LTD (Chen et al., 1999; Gomez-Palacio-Schjetnan y Escobar, 2008; Minichiello et al., 1999; Woo et al., 2005; Yang et al., 2014) e incluso generando per se incrementos de la eficiencia sináptica (Escobar, Figueroa-Guzman, y Gomez-Palacio-Schjetnan, 2003; Gomez-Palacio-Schjetnan y Escobar, 2008; Lin, Kavalali, y Monteggia, 2018; Martinez-Moreno, Rivera-Olvera, y Escobar, 2020; Rauti et al., 2020; Rivera-Olvera et al., 2016). Aunado a lo anterior, Silhol y colaboradores demostraron que el entrenamiento en un aprendizaje dependiente de hipocampo genera incrementos en la expresión del gen de BDNF, así como en los niveles de las proteínas pro-BDNF y TrkB en las regiones CA2 y CA3 hipocámpales (Silhol et al., 2007). Asimismo, se ha demostrado que el ejercicio físico provoca aumentos en los niveles de BDNF en el hipocampo que se correlacionan con un mejor desempeño en la tarea de laberinto acuático de Morris (Vaynman, Ying, y Gomez-Pinilla, 2004).

En este orden de ideas, varios autores han sugerido que el BDNF no sólo favorece la síntesis de PRPs, sino que incluso es un producto relacionado a la plasticidad per se (Fernandes y Carvalho, 2016; Sajikumar y Korte, 2011), capaz de modular los procesos homeostáticos en el sistema nervioso (Fernandes y Carvalho, 2016; Huber, Sawtell, y Bear, 1998; Jakawich et al., 2010; Rutherford, DeWan, Lauer, y Turrigiano, 1997; Sajikumar y Korte, 2011). Se ha propuesto que, durante el fenómeno de etiquetado y marcaje sináptico, el BDNF liberado presinápticamente participaría en el etiquetado de la sinapsis para la posterior captura de PRPs en las fases tardías de la LTP (Barco et al., 2005). Por su parte, el BDNF liberado postsinápticamente favorecería el mantenimiento de la LTP a través de la regulación de la expresión e inserción de las subunidades GluR1 de los receptores AMPA y NR2B de los receptores NMDA (Caldeira et al., 2007; Carvalho et al., 2008; Fortin et al., 2012).

La exposición breve a un AE atenúa la respuesta aversiva del CAS

Se ha comprobado que los animales alojados en un entorno enriquecido durante periodos prolongados son capaces de modular el impacto de estímulos aversivos intensos (Smith et al., 1998, Barbelivien et al., 2006, Beckmann y Bardo, 2012). A modo de ejemplo, Barbelivien y colaboradores demostraron que las ratas expuestas a AE mostraban una reducción en la conducta de miedo asociado con los eventos aversivos, presumiblemente debido a una regulación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA), aumentando la expresión del ARNm del receptor de glucocorticoides en el hipocampo (Barbelivien et al., 2006). Por su parte, Beckman y Bardo demostraron que el ambiente enriquecido reduce el valor del incentivo de una señal asociada a recompensa, mostrando una menor búsqueda de ésta respecto a animales alojados en condiciones estándar. Sugiriendo además que la reducción del valor del incentivo es mediada por la señalización dopaminérgica en los animales enriquecidos (Beckmann y Bardo, 2012). De hecho, Smail y colaboradores afirman que un atributo importante del AE es su capacidad para atenuar e incluso revertir estímulos aversivos (Smail et al., 2020). Sin embargo, a pesar de estos resultados alentadores, la investigación sobre los efectos de exposiciones breves al entorno enriquecido durante eventos estresantes ha sido considerablemente menos explorada. En este contexto, los resultados del presente estudio demuestran que una breve exposición al enriquecimiento ambiental reduce la intensidad de la respuesta aversiva del CAS.

Investigaciones previas han identificado que la exposición a un AE a corto plazo es capaz de favorecer la respuesta emocional de los animales ante eventos aversivos, así como mejorar el rendimiento en tareas estresantes (Leger et al., 2015; Koe, Ashokan y Mitra, 2016; Bhagya et al., 2017; Cavalcante et al., 2020). En el presente estudio, nos preguntamos si era posible atenuar la respuesta de aversión del CAS reduciendo la exposición temporal a un AE. En este sentido, un estudio de Abraham y colaboradores muestra que a partir de 7 días de exposición a un ambiente enriquecido es posible promover modificaciones en la comunicación sináptica que afectan la respuesta requerida para hacer frente al entorno (Abraham et al., 2005). Los resultados del presente estudio revelan que la exposición durante siete días a un AE es capaz de atenuar la respuesta de aversión ante un CAS fuerte, de manera similar a la atenuación generada tras una exposición de 21 días. En concordancia con estos hallazgos, el grupo de Cavalcante analizó los efectos temporales del AE sobre una memoria aversiva y sus efectos en las neuronas del sistema mesocorticolímbico de ratas, demostrando que dos y cuatro semanas de exposición a un AE favorecen de manera equiparable la extinción de una memoria de miedo

condicionado. Además, tanto la exposición durante 4 como durante 2 semanas a un AE, generaron cambios similares en la inmunorreactividad de Zif-268 en áreas mesocorticolímbicas como el área CA1 hipocampal y la amígdala central, así como de la Tirosina hidroxilasa (TH) en el área ventral tegmental (VTA) y el núcleo accumbens (Cavalcante et al., 2020). Asimismo, una investigación realizada por Leger y colaboradores muestra que la ejecución en la tarea de reconocimiento de objeto novedoso es similar en animales expuestos durante 1, 3 o 5 semanas a un ambiente enriquecido (Leger et al., 2015).

La exposición breve a un AE bloquea el mantenimiento de la LTP in vivo en la CI

Actualmente es ampliamente reconocido que el aprendizaje y la memoria dependen de procesos de plasticidad sináptica, donde estos procesos plásticos son regulados a su vez por mecanismos homeostáticos como la metaplasticidad, la cual modula los cambios en la fuerza sináptica de las neuronas dependiendo de su historial previo de actividad. En este sentido, se ha descrito que el entrenamiento en ciertas tareas aversivas, modifican la capacidad de expresar la potenciación y la depresión a largo plazo (LTD) subsecuente en el hipocampo, así como en la neocorteza (Hirata et al., 2009; Rivera-Olvera et al., 2016, 2018; Rodríguez-Durán et al., 2017; Stansley et al., 2018; Urrieta y Escobar, 2021).

En este contexto, estudios previos de nuestro grupo de investigación mostraron que un entrenamiento previo en el CAS modifica la capacidad para inducir una subsecuente LTP en la proyección BLA-CI, generada tanto por estimulación de alta frecuencia (Rodríguez-Durán et al., 2011; Rodríguez-Durán y Escobar, 2014), como por la administración de BDNF (Rivera-Olvera et al., 2016). Asimismo, nuestros estudios muestran que la inducción de la LTP en la proyección BLA-CI antes del entrenamiento en el CAS aumenta la retención de esta tarea (Escobar y Bermúdez-Rattoni, 2000; Rodríguez-Durán et al., 2017), mientras que la inducción de la LTD facilita su extinción (Rodríguez-Durán et al., 2017). Adicionalmente, nuestras investigaciones previas muestran que el entrenamiento en la extinción del CAS permite la inducción, pero no el mantenimiento de la LTP en la CI (Rivera-Olvera et al., 2018), de manera similar a lo reportado por Li y colaboradores, quienes describieron que la inducción de la LTD en la CI (en una proyección cortico – cortical) es bloqueada tras el proceso de extinción del CAS (Li et al., 2016).

De manera interesante, en el presente estudio demostramos que una breve exposición a un ambiente enriquecido permite la inducción, pero no el mantenimiento de la LTP en la vía BLA-CI. En este sentido, se ha demostrado que el AE es capaz de revertir la LTP previamente inducida en el hipocampo (Abraham et al., 2002, 2005). Asimismo, Qi y colaboradores mostraron que la exploración en un ambiente novedoso durante 30 minutos provoca una reversión rápida y persistente de la LTP en el hipocampo (Qi et al., 2013), en tanto que Irvine y colaboradores mostraron que la LTP inducida durante la exposición a un entorno enriquecido es menos persistente a lo largo de los días (Irvine et al., 2006).

De hecho, se ha demostrado que la exposición a eventos novedosos puede disminuir la transmisión sináptica basal y facilitar fenómenos de depotenciación (Kemp y Manahan-Vaughan, 2004; Hong et al., 2011; Dong et al., 2012; Qi et al., 2013). A modo de ejemplo, Buschler y Manahan-Vaughan demostraron que breves exposiciones a un AE pueden desencadenar cambios metaplásticos en los animales (Buschler y Manahan-Vaughan, 2012).

En este orden de ideas, estudios previos de nuestro grupo de investigación han mostrado que la extinción del CAS regula la respuesta ante la estimulación de la vía BLA-CI, es decir, mientras que el entrenamiento en el CAS incrementa la transmisión sináptica basal, la extinción revierte este fortalecimiento, permitiendo la inducción, pero no el mantenimiento de la LTP (Rivera-Olvera et al., 2018). Los presentes resultados sugieren que una breve exposición al AE podría desencadenar un mecanismo metaplástico similar al provocado por la extinción del CAS. De hecho, el análisis de las curvas I/O mostró que la transmisión sináptica basal del grupo expuesto al AE se redujo respecto al grupo control, lo cual posiblemente influye en el mantenimiento de la LTP, y como mencionamos previamente, este mecanismo podría subyacer a la reducción en la fortaleza del trazo de memoria. Al respecto, estudios previos de nuestro grupo de investigación han mostrado que el entrenamiento en el CAS es capaz de modificar la comunicación sináptica (Rodríguez-Durán et al., 2011; Rivera-Olvera et al., 2016) y esta modificación puede ser observada a través de la modulación de las curvas I/O (Rivera - Olvera et al., 2018; Urrieta y Escobar 2021). Además, se ha descrito que los cambios sinápticos dependientes del comportamiento también son capaces de alterar la subsecuente inducción de LTP en la vía involucrada (Hirata et al., 2009; Rodríguez-Durán et al., 2011). Los resultados del presente estudio muestran diferencias significativas en la curva I/O entre los grupos LTP y AE7+LTP, demostrando que la exposición a AE modifica la fuerza sináptica de la vía BLA-CI, esto sugiere que la modificación

dependiente del AE en la capacidad de inducir LTP podría depender del debilitamiento sináptico de la vía. Sin embargo, otros mecanismos tales como cambios en la función presináptica (Ganguly et al., 2000), modificaciones estructurales (Ramos-Languren y Escobar, 2013; Martínez-Moreno et al., 2020), cambios en la excitabilidad intrínseca (Irvine et al., 2006; Malik y Chattarji, 2012), así como diferentes neuromoduladores (Maity et al., 2015), también podrían participar en la cinética de las curvas I/O y en la expresión de la LTP.

Etiquetado conductual: Fortalecimiento de una respuesta aversiva débil como resultado de una breve exposición a un AE

Hoy en día la hipótesis de etiquetado y marcaje sináptico originalmente propuesta por Frey y Morris en 1997 es considerada como parte de los fundamentos neurobiológicos del aprendizaje y la memoria. De acuerdo con esta hipótesis la memoria de largo plazo requiere la síntesis de proteínas y ARNm denominados genéricamente productos relacionados a la plasticidad o PRPs para la estabilización y mantenimiento de los cambios sinápticos producidos por un nuevo aprendizaje (Frey y Morris, 1997). De manera análoga, existen investigaciones que muestran que la LTP genera el marcado local de las sinapsis involucradas y a su vez esas marcas podrían capturar productos relacionados a la plasticidad sintetizados en el soma debido a un evento previo de plasticidad sináptica, permitiendo así la estabilización de la potenciación durante periodos prolongados (Frey y Morris, 1997, 1998). Más recientemente y derivada de la hipótesis anterior, surge la hipótesis de etiquetado y marcaje conductual. Esta hipótesis explica cómo una experiencia conductual novedosa es capaz de inducir cambios plásticos en el cerebro que modificará los trazos de memoria ya establecidos a través de un proceso de etiquetado y marcaje sináptico (Davis et al., 2004; Viola et al., 2014; Moncada et al., 2015).

En este sentido, la hipótesis del etiquetado conductual desempeña un papel en la modulación de diferentes aprendizajes, incluso algunos aparentemente no relacionados. De hecho, se ha demostrado de manera consistente que la exploración de entornos novedosos mejora la plasticidad en el cerebro para promover el aprendizaje en animales a través de un proceso de etiquetado conductual (Li et al., 2003; Sajikumar y Frey, 2004; Lemon y Manahan-Vaughan, 2006). En el presente estudio, mostramos por vez primera que la exposición al enriquecimiento ambiental, llevada a cabo una hora después de la sesión de adquisición fortalece una respuesta aversiva débil en los animales. Nuestros resultados respaldan la idea de que un entorno novedoso puede influir en un aprendizaje aversivo de acuerdo con la hipótesis de etiquetado conductual (Moncada y Viola, 2007; Ballarini et al., 2009; Lopes da Cunha et al., 2019, 2022).

En este orden de ideas, un estudio previo realizado por nuestro grupo de investigación exploró las diferentes oleadas de síntesis proteica, relevantes para el proceso de consolidación de la memoria del CAS, encontrando que la persistencia de la memoria de esta tarea requiere una fase tardía dependiente de síntesis proteica de hasta 5 - 7 horas después de la adquisición, pero no más de 12 horas

(Martínez Moreno, Rodríguez-Durán y Escobar, 2011). En este contexto, nuestros resultados muestran que la etapa del proceso de memoria del CAS en la cual tiene lugar la exposición al ambiente enriquecido juega un papel clave en el procesamiento sináptico de las redes involucradas, modulado tentativamente a través de procesos de captura y marcaje sinápticos. Se ha descrito que la novedad inherente de los ambientes enriquecidos puede mejorar el aprendizaje y la memoria lo que contribuye a la adaptación y al desarrollo de habilidades cognitivas. Esta exposición a la novedad también puede tener impactos positivos en la plasticidad sináptica, promoviendo la formación de nuevas conexiones neuronales (Kempermann, 2019). Nuestros hallazgos, por primera vez, ofrecen información sobre la capacidad de modificar un trazo de memoria mediante la manipulación conductual, implementada dentro de una ventana temporal crítica para el proceso de consolidación.

En conjunto estos hallazgos proporcionan evidencia de como el AE es capaz de modular en diferentes ventanas temporales, un trazo de memoria aversivo restaurando los niveles de BDNF en la CI. Asimismo, es capaz de modificar el curso temporal de la expresión de plasticidad sináptica en áreas neocorticales implicadas en el procesamiento de estímulos aversivos. Finalmente, los resultados muestran también que la etapa del proceso de memoria en la cual tiene lugar la exposición a un AE puede determinar la dirección de la modulación observada. Estas observaciones subrayan la importancia de los ambientes enriquecidos como potenciales moduladores de los procesos de memoria asociados a eventos estresantes.

CONCLUSIONES

Los hallazgos obtenidos en el presente estudio revelan que:

1. La exposición durante 21 días a un AE atenúa la fuerza de la aversión de un CAS fuerte.
2. El AE restaura los niveles de BDNF en la CI alterado por el entrenamiento en el CAS.
3. La exposición durante 21 días a un AE no modifica la fuerza de la aversión de un CAS débil.
4. La exposición a un AE durante 7 días atenúa la fuerza de la aversión de un CAS fuerte.
5. La exposición a un AE durante 7 días disminuye la excitabilidad basal de la vía BLA-CI.
6. La exposición durante 7 días a un ambiente enriquecido bloquea el mantenimiento de la LTP en la vía BLA-CI
7. La exposición a un AE efectuada entre la sesión de adquisición y la prueba fortalece la memoria de aversión del CAS

REFERENCIAS

- Abraham, W. C. (2008). Metaplasticity: tuning synapses and networks for plasticity. *Nat Rev Neurosci*, 9(5), 387.
- Abraham, W. C., Jones, O. D., & Glanzman, D. L. (2019). Is plasticity of synapses the mechanism of long-term memory storage?. *NPJ science of learning*, 4(1), 9.
- Abraham, W. C., Logan, B., Greenwood, J. M., & Dragunow, M. (2002). Induction and experience-dependent consolidation of stable long-term potentiation lasting months in the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 22(21), 9626-9634.
- Abraham, W. C., Mason-Parker, S. E., Irvine, G. I., Logan, B., & Gill, A. I. (2006). Induction and activity-dependent reversal of persistent LTP and LTD in lateral perforant path synapses in vivo. *Neurobiology of learning and memory*, 86(1), 82-90.
- Alonso, M., Vianna, M. R., Depino, A. M., Mello e Souza, T., Pereira, P., Szapiro, G., ... & Medina, J. H. (2002). BDNF-triggered events in the rat hippocampus are required for both short-and long-term memory formation. *Hippocampus*, 12(4), 551-560.
- Ashokan, A., Hegde, A., & Mitra, R. (2016). Short-term environmental enrichment is sufficient to counter stress-induced anxiety and associated structural and molecular plasticity in basolateral amygdala. *Psychoneuroendocrinology*, 69, 189-196.
- Ballarini, F., Moncada, D., Martinez, M. C., Alen, N., & Viola, H. (2009). Behavioral tagging is a general mechanism of long-term memory formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(34), 14599-14604.
- Baltaci, S. B., Mogulkoc, R., & Baltaci, A. K. (2019). Molecular mechanisms of early and late LTP. *Neurochemical research*, 44, 281-296.
- Barbelivien, A., Herbeaux, K., Oberling, P., Kelche, C., Galani, R., & Majchrzak, M. (2006). Environmental enrichment increases responding to contextual cues but decreases overall conditioned fear in the rat. *Behav Brain Res*, 169(2), 231-238.
- Barco, A., Patterson, S. L., Alarcon, J. M., Gromova, P., Mata-Roig, M., Morozov, A., & 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), 123-137.
- Bayne, K. (2018). Environmental enrichment and mouse models: Current perspectives. *Animal Model Exp Med*, 1(2), 82-90. doi:10.1002/ame2.12015
- Bear, M. F., & Connors, B. W. (2004). *PARADISO MA, Neurociencia explorando el cerebro*.
- Bear, M., Connors, B., & Paradiso, M. (2016). *Neuroscience. Exploring the brain (4th ed.)*. Wolters Kluwer.
- Beckmann, J. S., & Bardo, M. T. (2012). Environmental enrichment reduces attribution of incentive salience to a food-associated stimulus. *Behav Brain Res*, 226(1), 331-334.
- Bekinschtein, P., Oomen, C. A., Saksida, L. M., & Bussey, T. J. (2011). Effects of environmental enrichment and voluntary exercise on neurogenesis, learning and memory, and pattern separation: ¿BDNF as a critical variable? *Semin Cell Dev Biol*, 22(5), 536-542.

- Benaroya-Milshtein, N., Hollander, N., Apter, A., Kukulansky, T., Raz, N., Wilf, A., . . . Pick, C. G. (2004). Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. *Eur J Neurosci*, 20(5), 1341-1347.
- Bhagya, V. R., Srikumar, B. N., Veena, J., & Shankaranarayana Rao, B. S. (2017). Short-term exposure to enriched environment rescues chronic stress-induced impaired hippocampal synaptic plasticity, anxiety, and memory deficits. *J Neurosci Res*, 95(8), 1602-1610.
- Bin Ibrahim, M. Z., Benoy, A., & Sajikumar, S. (2022). Long-term plasticity in the hippocampus: maintaining within and ‘tagging’ between synapses. *The FEBS journal*, 289(8), 2176-2201.
- Bliss, T. V., & Lømo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of physiology*, 232(2), 331-356.
- Bliss, T. V., Collingridge, G. L., Morris D Phil, FRS, R. G., & Reymann, K. G. (2018). Long-term potentiation in the hippocampus: discovery, mechanisms and function. *Neuroforum*, 24(3), A103-A120.
- Breed, M.D. & Moore, J. (2012). Learning. In *Animal Behavior* (pp. 125–150). Burlington, MA: Academic Press.
- Brigadski, T., & Leßmann, V. (2014). BDNF: a regulator of learning and memory processes with clinical potential. *Neuroforum*, 20(1), 1-11.
- Briones-Vidal, M. G., Reyes-García, S. E., & Escobar, M. L. (2024). Neurotrophin-3 into the insular cortex strengthens conditioned taste aversion memory. *Behavioural Brain Research*, 114857.
- Buschler, A., & Manahan-Vaughan, D. (2012). Brief environmental enrichment elicits metaplasticity of hippocampal synaptic potentiation in vivo. *Front Behav Neurosci*, 6, 85.
- Buschler, A., & Manahan-Vaughan, D. (2017). Metabotropic glutamate receptor, mGlu5, mediates enhancements of hippocampal long-term potentiation after environmental enrichment in young and old mice. *Neuropharmacology*, 115, 42-50.
- Cahill, L., & McGaugh, J. L. (1998). Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. *Trends in neurosciences*, 21(7), 294-299.
- Caldeira, M. V., Melo, C. V., Pereira, D. B., Carvalho, R. F., Carvalho, A. L., & Duarte, C. B. (2007). BDNF regulates the expression and traffic of NMDA receptors in cultured hippocampal neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 35(2), 208-219.
- Carleton, A., Accolla, R., & Simon, S. (2010). Coding in the mammalian gustatory system. *Trends in Neurosciences*, 33(7), 326-334.
- Carvalho, A. L., Caldeira, M. V., Santos, S. D., & Duarte, C. B. (2008). Role of the brain-derived neurotrophic factor at glutamatergic synapses. *Br J Pharmacol*, 153 Suppl 1, S310-324.
- Castillo, D. V., Figueroa-Guzman, Y., & Escobar, M. L. (2006). Brain-derived neurotrophic factor enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Res*, 1067(1), 250-255.

- Cavalcante, K. M. H., Bispo, J. M. M., Souza, M. F., Medeiros, K., Lins, L., Santos, E. R., . . . Santos, J. R. (2020). Short-term but not long-term exposure to an enriched environment facilitates the extinction of aversive memory. *Behav Brain Res*, 393, 112806.
- Chakraborty, P., Chattarji, S., & Jeanneteau, F. (2021). A salience hypothesis of stress in PTSD. *European Journal of Neuroscience*, 54(11), 8029-8051.
- Chen, G., Kolbeck, R., Barde, Y. A., Bonhoeffer, T., & Kossel, A. (1999). Relative contribution of endogenous neurotrophins in hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci*, 19(18), 7983-7990.
- Crofton, E. J., Zhang, Y., & Green, T. A. (2015). Inoculation stress hypothesis of environmental enrichment. *Neurosci Biobehav Rev*, 49, 19-31.
- Cunha, C., Brambilla, R., & Thomas, K. L. (2010). ¿A simple role for BDNF in learning and memory? *Front Mol Neurosci*, 3, 1.
- Davis, C. D., Jones, F. L., & Derrick, B. E. (2004). Novel environments enhance the induction and maintenance of long-term potentiation in the dentate gyrus. *Journal of Neuroscience*, 24(29), 6497-6506.
- De Carvalho Myskiw, J., Benetti, F., & Izquierdo, I. (2013). Behavioral tagging of extinction learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(3), 1071-1076.
- Diamond, M. C., Law, F., Rhodes, H., Lindner, B., Rosenzweig, M. R., Krech, D., & Bennett, E. L. (1966). Increases in cortical depth and glia numbers in rats subjected to enriched environment. *J Comp Neurol*, 128(1), 117-126.
- Dieni, S., Matsumoto, T., Dekkers, M., Rauskolb, S., Ionescu, M. S., Deogracias, R., ... & Barde, Y. A. (2012). BDNF and its pro-peptide are stored in presynaptic dense core vesicles in brain neurons. *Journal of Cell Biology*, 196(6), 775-788.
- Diógenes, M. J., Assaife-Lopes, N., Pinto-Duarte, A., Ribeiro, J. A., & Sebastiao, A. M. (2007). Influence of age on BDNF modulation of hippocampal synaptic transmission: interplay with adenosine A2A receptors. *Hippocampus*, 17(7), 577-585.
- Domjan, M. (2005). Pavlovian conditioning: A functional perspective. *Annu. Rev. Psychol.*, 56, 179-206.
- Dong, Z., Gong, B., Li, H., Bai, Y., Wu, X., Huang, Y., ... & Wang, Y. T. (2012). Mechanisms of hippocampal long-term depression are required for memory enhancement by novelty exploration. *Journal of Neuroscience*, 32(35), 11980-11990.
- Doyle, M., & Kiebler, M. A. (2011). Mechanisms of dendritic mRNA transport and its role in synaptic tagging. *The EMBO journal*, 30(17), 3540-3552.
- Dudai, Y. (2004). The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu. Rev. Psychol.*, 55, 51-86.
- Duffy, S. N., Craddock, K. J., Abel, T., & Nguyen, P. V. (2001). Environmental enrichment modifies the PKA-dependence of hippocampal LTP and improves hippocampus-dependent memory. *Learning & Memory*, 8(1), 26-34.

- Dunsmoor, J. E., Murty, V. P., Clewett, D., Phelps, E. A., & Davachi, L. (2022). Tag and capture: how salient experiences target and rescue nearby events in memory. *Trends in Cognitive Sciences*.
- Eckert, M. J., & Abraham, W. C. (2012). Effects of environmental enrichment exposure on synaptic transmission and plasticity in the hippocampus. In *Neurogenesis and neural plasticity* (pp. 165-187): Springer.
- Escobar, M. L., & Bermudez-Rattoni, F. (2000). Long-term potentiation in the insular cortex enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Res*, 852(1), 208-212.
- Escobar, M. L., & Derrick, B. (2007). Long-term potentiation and depression as putative mechanisms for memory formation. *Neural Plasticity and Memory: From Genes to Brain Imaging*, 15-45.
- Escobar, M. L., Figueroa-Guzman, Y., & Gomez-Palacio-Schjetnan, A. (2003). In vivo insular cortex LTP induced by brain-derived neurotrophic factor. *Brain Res*, 991(1-2), 274-279.
- Etkin, A., Büchel, C., & Gross, J. J. (2015). The neural bases of emotion regulation. *Nature reviews neuroscience*, 16(11), 693-700.
- Foster, T. C., & Dumas, T. C. (2001). Mechanism for increased hippocampal synaptic strength following differential experience. *J Neurophysiol*, 85(4), 1377-1383.
- Foster, T. C., Gagne, J., & Massicotte, G. (1996). Mechanism of altered synaptic strength due to experience: relation to long-term potentiation. *Brain Res*, 736(1-2), 243-250.
- Fox, C., Merali, Z., & Harrison, C. (2006). Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress. *Behav Brain Res*, 175(1), 1-8.
- Foy, M. R., & Foy, J. G. (2009). Conditioned taste aversion.
- Frey, S., & Frey, J. U. (2008). 'Synaptic tagging' and 'cross-tagging' and related associative reinforcement processes of functional plasticity as the cellular basis for memory formation. *Progress in brain research*, 169, 117-143.
- Frey, U., & Morris, R. G. (1997). Synaptic tagging and long-term potentiation. *Nature*, 385(6616), 533-536.
- Frey, U., & Morris, R. G. (1998). Weak before strong: dissociating synaptic tagging and plasticity-factor accounts of late-LTP. *Neuropharmacology*, 37(4-5), 545-552.
- Fuss, J., Ben Abdallah, N. M., Vogt, M. A., Touma, C., Pacifici, P. G., Palme, R., . . . Gass, P. (2010). Voluntary exercise induces anxiety-like behavior in adult C57BL/6J mice correlating with hippocampal neurogenesis. *Hippocampus*, 20(3), 364-376.
- Ganguly, K., Kiss, L., & Poo, M. M. (2000). Enhancement of presynaptic neuronal excitability by correlated presynaptic and postsynaptic spiking. *Nature neuroscience*, 3(10), 1018-1026.
- Garcia, J., & Koelling, R. A. (1966). Relation of cue to consequence in avoidance learning. *Psychonomic science*, 4, 123-124.
- Garcia, J., Kimeldorf, D. J., & Koelling, R. A. (1955). Conditioned aversion to saccharin resulting from exposure to gamma radiation. *Science*, 122(3160), 157-158.

- Garcia, J., Lasiter, P. S., Bermudes-Rattoni F., & Deems, D. A. (1985). A general theory of aversion learning. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 443(1), 8-21.
- Givalois, L., Naert, G., Rage, F., Ixart, G., Arancibia, S., & Tapia-Arancibia, L. (2004). A single brain-derived neurotrophic factor injection modifies hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis activity in adult male rats. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 27(3), 280-295.
- Globus, A., Rosenzweig, M. R., Bennett, E. L., & Diamond, M. C. (1973). Effects of differential experience on dendritic spine counts in rat cerebral cortex. *J Comp Physiol Psychol*, 82(2), 175-181.
- Gogolla, N. (2017). The insular cortex. *Current Biology*, 27(12), R580-R586.
- Golden, S. A., Covington, H. E., 3rd, Berton, O., & Russo, S. J. (2011). A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. *Nat Protoc*, 6(8), 1183-1191.
- Gomez-Palacio-Schjetnan, A., & Escobar, M. L. (2008). In vivo BDNF modulation of adult functional and morphological synaptic plasticity at hippocampal mossy fibers. *Neurosci Lett*, 445(1), 62-67.
- Gonzalez-Lima, F., Ferchmin, P. A., Eterovic, V. A., & Gonzalez-Lima, E. M. (1994). Metabolic activation of the brain of young rats after exposure to environmental complexity. *Dev Psychobiol*, 27(6), 343-351.
- Gorski, J. A., Zeiler, S. R., Tamowski, S., & Jones, K. R. (2003). Brain-derived neurotrophic factor is required for the maintenance of cortical dendrites. *Journal of Neuroscience*, 23(17), 6856-6865.
- Gros, A., & Wang, S. H. (2018). Behavioral tagging and capture: long-term memory decline in middle-aged rats. *Neurobiol Aging*, 67, 31-41.
- Gutiérrez-Vera, B., Reyes-García, S. E., & Escobar, M. L. (2023). Brief environmental enrichment elicits metaplasticity on the insular cortex in vivo and reduces the strength of conditioned taste aversion. *Neurobiology of Learning and Memory*, 205, 107840.
- Gutiérrez-Vera, B., Rivera-Olvera, A., & Escobar, M. L. (2022). Environmental enrichment attenuates conditioned taste aversion through the restoration of BDNF levels in the insular cortex. *Behavioural Brain Research*, 113947.
- Hall, J., Thomas, K. L., & Everitt, B. J. (2000). Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning. *Nature neuroscience*, 3(6), 533-535.
- Hamann, S. B., Ely, T. D., Grafton, S. T., & Kilts, C. D. (1999). Amygdala activity related to enhanced memory for pleasant and aversive stimuli. *Nature neuroscience*, 2(3), 289-293.
- Hegde, A., Suresh, S., & Mitra, R. (2020). Early-life short-term environmental enrichment counteracts the effects of stress on anxiety-like behavior, brain-derived neurotrophic factor and nuclear translocation of glucocorticoid receptors in the basolateral amygdala. *Sci Rep*, 10(1), 14053.
- Heldt, S. A., Stanek, L., Chhatwal, J. P., & Ressler, K. (2007). Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. *Molecular psychiatry*, 12(7), 656-670.

- Hendershott, T. R., Cronin, M. E., Langella, S., McGuinness, P. S., & Basu, A. C. (2016). Effects of environmental enrichment on anxiety-like behavior, sociability, sensory gating, and spatial learning in male and female C57BL/6J mice. *Behav Brain Res*, 314, 215-225.
- Hennessy, J. W., Smotherman, W. P., & Levine, S. (1980). Investigations into the nature of the dexamethasone and ACTH effects upon learned taste aversion. *Physiology & Behavior*, 24(4), 645-649.
- Herring, B. E., & Nicoll, R. A. (2016). Kalirin and Trio proteins serve critical roles in excitatory synaptic transmission and LTP. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(8), 2264-2269.
- Herry, C., Ferraguti, F., Singewald, N., Letzkus, J. J., Ehrlich, I., & Lüthi, A. (2010). Neuronal circuits of fear extinction. *European Journal of Neuroscience*, 31(4), 599-612.
- Hirata, R., Matsumoto, M., Judo, C., Yamaguchi, T., Izumi, T., Yoshioka, M., & Togashi, H. (2009). Possible relationship between the stress-induced synaptic response and metaplasticity in the hippocampal CA1 field of freely moving rats. *Synapse*, 63(7), 549-556.
- Hong, I., Kim, J., Lee, J., Park, S., Song, B., Kim, J., ... & Choi, S. (2011). Reversible plasticity of fear memory-encoding amygdala synaptic circuits even after fear memory consolidation. *PLoS One*, 6(9), e24260.
- Huber, K. M., Sawtell, N. B., & Bear, M. F. (1998). Brain-derived neurotrophic factor alters the synaptic modification threshold in visual cortex. *Neuropharmacology*, 37(4-5), 571-579.
- Ickes, B. R., Pham, T. M., Sanders, L. A., Albeck, D. S., Mohammed, A. H., & Granholm, A. C. (2000). Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. *Exp Neurol*, 164(1), 45-52.
- Ingram, D. K. (2001). Rodent models of age-related memory impairment. In *Functional neurobiology of aging* (pp. 373-386). Academic Press.
- Irvine, G. I., & Abraham, W. C. (2005). Enriched environment exposure alters the input-output dynamics of synaptic transmission in area CA1 of freely moving rats. *Neurosci Lett*, 391(1-2), 32-37.
- Irvine, G. I., Logan, B., Eckert, M., & Abraham, W. C. (2006). Enriched environment exposure regulates excitability, synaptic transmission, and LTP in the dentate gyrus of freely moving rats. *Hippocampus*, 16(2), 149-160.
- Izquierdo, I., Quirfeldt, J. A., Zanatta, M. S., Quevedo, J., Schaeffer, E., Schmitz, P. K., & Medina, J. H. (1997). Sequential role of hippocampus and amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in formation and retrieval of memory for inhibitory avoidance in rats. *Eur J Neurosci*, 9(4), 786-793.
- Jahng, Jeong Won, et al. "Nw-nitro-L-arginine methyl ester attenuates lithium-induced c-Fos, but not conditioned taste aversion, in rats." *Neuroscience research* 50.4 (2004): 485-492.
- Jakawich, S. K., Nasser, H. B., Strong, M. J., McCartney, A. J., Perez, A. S., Rakesh, N., . . . Sutton, M. A. (2010). Local presynaptic activity gates homeostatic changes in presynaptic function driven by dendritic BDNF synthesis. *Neuron*, 68(6), 1143-1158.

- Ji, Y., Lu, Y., Yang, F., Shen, W., Tang, T. T. T., Feng, L., ... & Lu, B. (2010). Acute and gradual increases in BDNF concentration elicit distinct signaling and functions in neurons. *Nature neuroscience*, 13(3), 302-309.
- 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(8), 1219-1228.
- Kandel, E. R. (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science*, 294(5544), 1030-1038.
- Kemp, A., & Manahan-Vaughan, D. (2004). Hippocampal long-term depression and long-term potentiation encode different aspects of novelty acquisition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(21), 8192-8197.
- Kempermann, G. (2019). Environmental enrichment, new neurons and the neurobiology of individuality. *Nat Rev Neurosci*, 20(4), 235-245.
- Kentner, A. C., Lambert, K. G., Hannan, A. J., & Donaldson, S. T. (2019). Editorial: Environmental Enrichment: Enhancing Neural Plasticity, Resilience, and Repair. *Front Behav Neurosci*, 13, 75.
- Kesslak, J. P., So, V., Choi, J., Cotman, C. W., & Gomez-Pinilla, F. (1998). Learning upregulates brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid: a mechanism to facilitate encoding and circuit maintenance?. *Behavioral neuroscience*, 112(4), 1012.
- Kirkwood, A., Rioult, M. G., & Bear, M. F. (1996). Experience-dependent modification of synaptic plasticity in visual cortex. *Nature*, 381(6582), 526-528.
- Kondo, M., Takei, Y., & Hirokawa, N. (2012). Motor protein KIF1A is essential for hippocampal synaptogenesis and learning enhancement in an enriched environment. *Neuron*, 73(4), 743-757.
- Koponen, E., Vöikar, V., Riekk, R., Saarelainen, T., Rauramaa, T., Rauvala, H., ... & Castrén, E. (2004). Transgenic mice overexpressing the full-length neurotrophin receptor *trkB* exhibit increased activation of the *trkB*-PLC γ pathway, reduced anxiety, and facilitated learning. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 26(1), 166-181.
- Koren, T., Amer, M., Krot, M., Boshnak, N., Ben-Shaanan, T. L., Azulay-Debby, H., ... & Rolls, A. (2021). Insular cortex neurons encode and retrieve specific immune responses. *Cell*, 184(24), 5902-5915.
- Koren, T., Amer, M., Krot, M., Boshnak, N., Ben-Shaanan, T. L., Azulay-Debby, H., ... & Rolls, A. (2021). Insular cortex neurons encode and retrieve specific immune responses. *Cell*, 184(24), 5902-5915.
- Kowianski, P., Lietzau, G., Czuba, E., Waskow, M., Steliga, A., & Morys, J. (2018). BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. *Cell Mol Neurobiol*, 38(3), 579-593.
- Labrakakis, C. (2023). The Role of the insular Cortex in Pain. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5736.
- Larsson, F., Winblad, B., & Mohammed, A. H. (2002). Psychological stress and environmental adaptation in enriched vs. impoverished housed rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 73(1), 193-207.

- Lavi, K., Jacobson, G. A., Rosenblum, K., & Lüthi, A. (2018). Encoding of conditioned taste aversion in cortico-amygdala circuits. *Cell reports*, 24(2), 278-283.
- Leger, M., Bouet, V., Freret, T., Darmaillacq, A. S., Dacher, M., Dauphin, F., . . . Schumann-Bard, P. (2012). Environmental enrichment improves recent but not remote memory in association with a modified brain metabolic activation profile in adult mice. *Behav Brain Res*, 228(1), 22-29.
- Leger, M., Paizanis, E., Dzahini, K., Quiedeville, A., Bouet, V., Cassel, J. C., . . . Boulouard, M. (2015). Environmental Enrichment Duration Differentially Affects Behavior and Neuroplasticity in Adult Mice. *Cereb Cortex*, 25(11), 4048-4061.
- Lehmann, M. L., & Herkenham, M. (2011). Environmental enrichment confers stress resiliency to social defeat through an infralimbic cortex-dependent neuroanatomical pathway. *J Neurosci*, 31(16), 6159-6173.
- Lemon, N., & Manahan-Vaughan, D. (2006). Dopamine D1/D5 receptors gate the acquisition of novel information through hippocampal long-term potentiation and long-term depression. *Journal of Neuroscience*, 26(29), 7723-7729.
- Leßmann, V., & Brigadski, T. (2009). Mechanisms, locations, and kinetics of synaptic BDNF secretion: an update. *Neuroscience research*, 65(1), 11-22.
- Li, J., Park, E., Zhong, L. R., & Chen, L. (2019). Homeostatic synaptic plasticity as a metaplasticity mechanism a molecular and cellular perspective. *Current opinion in neurobiology*, 54, 44-53.
- Lin, P. Y., Kavalali, E. T., & Monteggia, L. M. (2018). Genetic Dissection of Presynaptic and Postsynaptic BDNF-TrkB Signaling in Synaptic Efficacy of CA3-CA1 Synapses. *Cell Rep*, 24(6), 1550-1561.
- Linnarsson, S., Björklund, A., & Ernfors, P. (1997). Learning deficit in BDNF mutant mice. *European Journal of Neuroscience*, 9(12), 2581-2587.
- Lisman, J., Grace, A. A., & Duzel, E. (2011). A neoHebbian framework for episodic memory; role of dopamine-dependent late LTP. *Trends in neurosciences*, 34(10), 536-547.
- Liu, I. Y., Lyons, W. E., Mamounas, L. A., & Thompson, R. F. (2004). Brain-derived neurotrophic factor plays a critical role in contextual fear conditioning. *Journal of Neuroscience*, 24(36), 7958-7963.
- Lopes da Cunha, P., Tintorelli, R., Correa, J., Budriesi, P., & Viola, H. (2022). Behavioral tagging as a mechanism for aversive-memory formation under acute stress. *European Journal of Neuroscience*, 55(9-10), 2651-2665.
- Lopes da Cunha, P., Villar, M. E., Ballarini, F., Tintorelli, R., & Ana María Viola, H. (2019). Spatial object recognition memory formation under acute stress. *Hippocampus*, 29(6), 491-499.
- Lu, Y., Ji, Y., Ganesan, S., Schloesser, R., Martinowich, K., Sun, M., ... & Lu, B. (2011). TrkB as a potential synaptic and behavioral tag. *Journal of Neuroscience*, 31(33), 11762-11771.
- Ma, L., Wang, D. D., Zhang, T. Y., Yu, H., Wang, Y., Huang, S. H., ... & Chen, Z. Y. (2011). Region-specific involvement of BDNF secretion and synthesis in conditioned taste aversion memory formation. *Journal of Neuroscience*, 31(6), 2079-2090.

- Maity, S., Rah, S., Sonenberg, N., Gkogkas, C. G., & Nguyen, P. V. (2015). Norepinephrine triggers metaplasticity of LTP by increasing translation of specific mRNAs. *Learning & Memory*, 22(10), 499.
- Malezieux, M., Klein, A. S., & Gogolla, N. (2023). Neural circuits for emotion. *Annual review of neuroscience*, 46, 211-231.
- Malik, R., & Chattarji, S. (2012). Enhanced intrinsic excitability and EPSP-spike coupling accompany enriched environment-induced facilitation of LTP in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Journal of neurophysiology*, 107(5), 1366-1378.
- Marmigère, F., Givalois, L., Rage, F., Arancibia, S., & Tapia-Arancibia, L. (2003). Rapid induction of BDNF expression in the hippocampus during immobilization stress challenge in adult rats. *Hippocampus*, 13(5), 646-655.
- Martinez-Moreno, A., Rivera-Olvera, A., & Escobar, M. L. (2020). 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. *Neurobiol Learn Mem*, 167, 107125.
- Martínez-Moreno, A., Rodríguez-Durán, L. F., & Escobar, M. L. (2011). Late protein synthesis-dependent phases in CTA long-term memory: BDNF requirement. *Frontiers in behavioral neuroscience*,
- Martínez-Moreno, A., Rodríguez-Durán, L. F., & Escobar, M. L. (2016). Brain-derived neurotrophic factor into adult neocortex strengthens a taste aversion memory. *Behavioural Brain Research* SreeTestContent1, 297, 1-4.
- Matsuda, N., Lu, H., Fukata, Y., Noritake, J., Gao, H., Mukherjee, S., ... & Poo, M. M. (2009). Differential activity-dependent secretion of brain-derived neurotrophic factor from axon and dendrite. *Journal of Neuroscience*, 29(45), 14185-14198.
- Mayford, M., Siegelbaum, S. A., & Kandel, E. R. (2012). Synapses and memory storage. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(6).
- McGaugh, J. L. (2015). Consolidating memories. *Annual review of psychology*, 66, 1-24.
- McQuaid, R. J., Dunn, R., Jacobson-Pick, S., Anisman, H., & Audet, M. C. (2018). Post-weaning Environmental Enrichment in Male CD-1 Mice: Impact on Social Behaviors, Corticosterone Levels and Prefrontal Cytokine Expression in Adulthood. *Front Behav Neurosci*, 12, 145.
- Messaoudi, E., Kanhema, T., Soulé, J., Tiron, A., Dageyte, G., da Silva, B., & Bramham, C. R. (2007). Sustained Arc/Arg3.1 synthesis controls long-term potentiation consolidation through regulation of local actin polymerization in the dentate gyrus in vivo. *Journal of Neuroscience*, 27(39), 10445-10455.
- Minichiello, L., Korte, M., Wolfner, D., Kuhn, R., Unsicker, K., Cestari, V., ... Klein, R. (1999). Essential role for TrkB receptors in hippocampus-mediated learning. *Neuron*, 24(2), 401-414.
- Mizuno, M., Yamada, K., Olariu, A., Nawa, H., & Nabeshima, T. (2000). Involvement of brain-derived neurotrophic factor in spatial memory formation and maintenance in a radial arm maze test in rats. *Journal of Neuroscience*, 20(18), 7116-7121.
- Moncada, D., & Viola, H. (2007). Induction of long-term memory by exposure to novelty requires protein synthesis: evidence for a behavioral tagging. *Journal of Neuroscience*, 27(28), 7476-7481.

- Moncada, D., Ballarini, F., & Viola, H. (2015). Behavioral tagging: a translation of the synaptic tagging and capture hypothesis. *Neural plasticity*, 2015.
- Monfils, M. H., & Teskey, G. C. (2004). Skilled-learning-induced potentiation in rat sensorimotor cortex: a transient form of behavioural long-term potentiation. *Neuroscience*, 125(2), 329-336.
- Monteggia, L. M., Barrot, M., Powell, C. M., Berton, O., Galanis, V., Gemelli, T., ... & Nestler, E. J. (2004). Essential role of brain-derived neurotrophic factor in adult hippocampal function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(29), 10827-10832.
- Myers, K. M., Ressler, K. J., & Davis, M. (2006). Different mechanisms of fear extinction dependent on length of time since fear acquisition. *Learning & Memory*, 13(2), 216-223.
- Nicoll, R. A. (2017). A brief history of long-term potentiation. *neuron*, 93(2), 281-290.
- Nikolaev, E., Kaczmarek, L., Zhu, S. W., Winblad, B., & Mohammed, A. H. (2002). Environmental manipulation differentially alters c-Fos expression in amygdaloid nuclei following aversive conditioning. *Brain Res*, 957(1), 91-98.
- Nithianantharajah, J., & Hannan, A. J. (2006). Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat Rev Neurosci*, 7(9), 697-709.
- Nomoto, M., & Inokuchi, K. (2018). Behavioral, cellular, and synaptic tagging frameworks. *Neurobiol Learn Mem*, 153(Pt A), 13-20.
- Novaes, L. S., Dos Santos, N. B., Perfetto, J. G., Goosens, K. A., & Munhoz, C. D. (2018). Environmental enrichment prevents acute restraint stress-induced anxiety-related behavior but not changes in basolateral amygdala spine density. *Psychoneuroendocrinology*, 98, 6-10.
- Núñez-Jaramillo, L., Ramírez-Lugo, L., Herrera-Morales, W., & Miranda, M. I. (2010). Taste memory formation: latest advances and challenges. *Behavioural brain research*, 207(2), 232-248.
- Ohline, S. M., & Abraham, W. C. (2019). Environmental enrichment effects on synaptic and cellular physiology of hippocampal neurons. *Neuropharmacology*, 145(Pt A), 3-12.
- Okada, D., Ozawa, F., & Inokuchi, K. (2009). Input-specific spine entry of soma-derived Ves1-1S protein conforms to synaptic tagging. *Science*, 324(5929), 904-909.
- Okuda, K., Højgaard, K., Privitera, L., Bayraktar, G., & Takeuchi, T. (2021). Initial memory consolidation and the synaptic tagging and capture hypothesis. *European Journal of Neuroscience*, 54(8), 6826-6849.
- Pacheco-López, G., Doenlen, R., Krügel, U., Arnold, M., Wirth, T., Riether, C., ... & Schedlowski, M. (2013). Neurobehavioural activation during peripheral immunosuppression. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 16(1), 137-149.
- Perez-Otano, I., & Ehlers, M. D. (2005). Homeostatic plasticity and NMDA receptor trafficking. *Trends Neurosci*, 28(5), 229-238.
- Philpot, B. D., Espinosa, J. S., & Bear, M. F. (2003). Evidence for altered NMDA receptor function as a basis for metaplasticity in visual cortex. *Journal of Neuroscience*, 23(13), 5583-5588.

- Prilutski, Y., & Livneh, Y. (2023). Physiological needs: Sensations and predictions in the insular cortex. *Physiology*, 38(2), 73-81.
- Qi, Y., Hu, N. W., & Rowan, M. J. (2013). Switching off LTP: mGlu and NMDA receptor-dependent novelty exploration-induced depotentiation in the rat hippocampus. *Cerebral Cortex*, 23(4), 932-939.
- 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.
- Radabaugh, H. L., Carlson, L. J., O'Neil, D. A., LaPorte, M. J., Monaco, C. M., Cheng, J. P., . . . Kline, A. E. (2016). Abbreviated environmental enrichment confers neurobehavioral, cognitive, and histological benefits in brain-injured female rats. *Exp Neurol*, 286, 61-68.
- Rage, F., Givalois, L., Marmigere, F., Tapia-Arancibia, L., & Arancibia, S. (2002). Immobilization stress rapidly modulates BDNF mRNA expression in the hypothalamus of adult male rats. *Neuroscience*, 112(2), 309-318.
- Ramírez-Amaya, V., & Bermudez-Rattoni, F. (1999). Conditioned enhancement of antibody production is disrupted by insular cortex and amygdala but not hippocampal lesions. *Brain, behavior, and immunity*, 13(1), 46-60.
- Rattiner, L. M., Davis, M., French, C. T., & Ressler, K. J. (2004). Brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor B involvement in amygdala-dependent fear conditioning. *J Neurosci*, 24(20), 4796-4806.
- Rauti, R., Cellot, G., D'Andrea, P., Colliva, A., Scaini, D., Tongiorgi, E., & Ballerini, L. (2020). BDNF impact on synaptic dynamics: extra or intracellular long-term release differently regulates cultured hippocampal synapses. *Mol Brain*, 13(1), 43.
- Redondo, R. L., & Morris, R. G. (2011). Making memories last: the synaptic tagging and capture hypothesis. *Nature Reviews Neuroscience*, 12(1), 17-30.
- Renner, M. J., & Rosenzweig, M. R. (1987). The golden-mantled ground squirrel (*Spermophilus lateralis*) as a model for the effects of environmental enrichment in solitary animals. *Developmental Psychobiology: The Journal of the International Society for Developmental Psychobiology*, 20(1), 19-24.
- Reymann, K. G., & Frey, J. U. (2007). The late maintenance of hippocampal LTP: requirements, phases, 'synaptic tagging', 'late-associativity' and implications. *Neuropharmacology*, 52(1), 24-40.
- Rivera-Olvera, A., Rodriguez-Duran, 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. *Neurobiol Learn Mem*, 130, 71-76.
- Rodriguez-Duran, 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. *Behav Brain Res*, 266, 58-62.
- Rodriguez-Duran, 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. *Neurobiol Learn Mem*, 95(4), 519-526.

- Rodriguez-Duran, L. F., Martinez-Moreno, A., & Escobar, M. L. (2017). Bidirectional modulation of taste aversion extinction by insular cortex LTP and LTD. *Neurobiol Learn Mem*, 142(Pt A), 85-90.
- Rodriguez-Serrano, L. M., Ramirez-Leon, B., Rodriguez-Duran, L. F., & Escobar, M. L. (2014). Acute infusion of brain-derived neurotrophic factor in the insular cortex promotes conditioned taste aversion extinction. *Neurobiol Learn Mem*, 116, 139-144.
- Rolls, A. (2023). Immunoception: the insular cortex perspective. *Cellular & Molecular Immunology*, 20(11), 1270-1276.
- Rosenzweig, M. R., Krech, D., Bennett, E. L., & Diamond, M. C. (1962). Effects of environmental complexity and training on brain chemistry and anatomy: a replication and extension. *J Comp Physiol Psychol*, 55, 429-437.
- Rossi, C., Angelucci, A., Costantin, L., Braschi, C., Mazzantini, M., Babbini, F., . . . Caleo, M. (2006). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. *Eur J Neurosci*, 24(7), 1850-1856.
- Rutherford, L. C., DeWan, A., Lauer, H. M., & Turrigiano, G. G. (1997). Brain-derived neurotrophic factor mediates the activity-dependent regulation of inhibition in neocortical cultures. *J Neurosci*, 17(12), 4527-4535.
- Sajikumar, S., & Frey, J. U. (2004). Late-associativity, synaptic tagging, and the role of dopamine during LTP and LTD. *Neurobiology of learning and memory*, 82(1), 12-25.
- Sajikumar, S., & Korte, M. (2011). Metaplasticity governs compartmentalization of synaptic tagging and capture through brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and protein kinase Mzeta (PKMzeta). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(6), 2551-2556.
- Schwarze, U., Bingel, U., & Sommer, T. (2012). Event-related nociceptive arousal enhances memory consolidation for neutral scenes. *Journal of Neuroscience*, 32(4), 1481-1487.
- Shen, J., Li, Y., Qu, C., Xu, L., Sun, H., & Zhang, J. (2019). The enriched environment ameliorates chronic unpredictable mild stress-induced depressive-like behaviors and cognitive impairment by activating the SIRT1/miR-134 signaling pathway in hippocampus. *J Affect Disord*, 248, 81-90.
- Shilpa, B. M., Bhagya, V., Harish, G., Srinivas Bharath, M. M., & Shankaranarayana Rao, B. S. (2017). Environmental enrichment ameliorates chronic immobilisation stress-induced spatial learning deficits and restores the expression of BDNF, VEGF, GFAP and glucocorticoid receptors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 76, 88-100.
- Shohamy, D., & Adcock, R. A. (2010). Dopamine and adaptive memory. *Trends in cognitive sciences*, 14(10), 464-472.
- Silhol, M., Arancibia, S., Maurice, T., & Tapia-Arancibia, L. (2007). Spatial memory training modifies the expression of brain-derived neurotrophic factor tyrosine kinase receptors in young and aged rats. *Neuroscience*, 146(3), 962-973.
- Singhal, G., Jaehne, E. J., Corrigan, F., & Baune, B. T. (2014). Cellular and molecular mechanisms of immunomodulation in the brain through environmental enrichment. *Front Cell Neurosci*, 8, 97.

- Smail, M. A., Smith, B. L., Nawreen, N., & Herman, J. P. (2020). Differential impact of stress and environmental enrichment on corticolimbic circuits. *Pharmacol Biochem Behav*, 197, 172993.
- Smith, J. K., Neill, J. C., & Costall, B. (1998). The influence of postweaning housing conditions on drug-induced conditioned taste aversion. *Pharmacol Biochem Behav*, 59(2), 379-386.
- Spencer, Corinne M., et al. "Lithium-induced gene expression of inducible cyclic adenosine monophosphate early repressor in the rat adrenal gland." *Journal of neuroscience research* 82.2 (2005): 273-282.
- Stansley, B. J., Fisher, N. M., Gogliotti, R. G., Lindsley, C. W., Conn, P. J., & Niswender, C. M. (2018). Contextual fear extinction induces hippocampal metaplasticity mediated by metabotropic glutamate receptor 5. *Cerebral Cortex*, 28(12), 4291-4304.
- Staszko, S., & Boughter, J. (2020). Taste Pathways, Representation and Processing in the Brain. En B. Fritzsche (Ed), *The Senses: A Comprehensive Reference* (2nd ed., pp. 280-297), Elsevier.
- Staszko, S., Boughter, J., & Fletcher M. (2020). Taste coding strategies in insular cortex. *Experimental Biology and Medicine*, 245(5), 448-455.
- Sugawara, M., Hashimoto, K., Hattori, T., Takao, T., Suemaru, S., & Ota, Z. (1988). Effects of lithium on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Endocrinologia japonica*, 35(5), 655-663.
- Sun, H., Zhang, J., Zhang, L., Liu, H., Zhu, H., & Yang, Y. (2010). Environmental enrichment influences BDNF and NR1 levels in the hippocampus and restores cognitive impairment in chronic cerebral hypoperfused rats. *Curr Neurovasc Res*, 7(4), 268-280.
- Sztainberg, Y., & Chen, A. (2010). An environmental enrichment model for mice. *Nat Protoc*, 5(9), 1535-1539.
- Tambini, A., Rimmele, U., Phelps, E. A., & Davachi, L. (2017). Emotional brain states carry over and enhance future memory formation. *Nature neuroscience*, 20(2), 271-278.
- Tang, Y. P., Wang, H., Feng, R., Kyin, M., & Tsien, J. Z. (2001). Differential effects of enrichment on learning and memory function in NR2B transgenic mice. *Neuropharmacology*, 41(6), 779-790.
- Tanichi, M., Toda, H., Shimizu, K., Koga, M., Saito, T., Enomoto, S., . . . Yoshino, A. (2018). Differential effects of voluntary wheel running and toy rotation on the mRNA expression of neurotrophic factors and FKBP5 in a post-traumatic stress disorder rat model with the shuttle-box task. *Biochem Biophys Res Commun*, 501(1), 307-312.
- Tebano, M. T., Martire, A., Potenza, R. L., Grò, C., Peponi, R., Armida, M., ... & Popoli, P. (2008). Adenosine A2A receptors are required for normal BDNF levels and BDNF-induced potentiation of synaptic transmission in the mouse hippocampus. *Journal of neurochemistry*, 104(1), 279-286.
- Turner, C. A., Yang, M. C., & Lewis, M. H. (2002). Environmental enrichment: effects on stereotyped behavior and regional neuronal metabolic activity. *Brain Res*, 938(1-2), 15-21.
- Urrieta, E., & Escobar, M. L. (2021). Metaplastic regulation of neocortical long-term depression in vivo is sensitive to distinct phases of conditioned taste aversion. *Neurobiology of Learning and Memory*, 182, 107449.

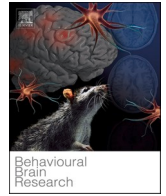
- Vaynman, S., Ying, Z., & Gomez-Pinilla, F. (2004). Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. *Eur J Neurosci*, 20(10), 2580-2590.
- Viola, H., Ballarini, F., Martinez, M. C., & Moncada, D. (2014). The tagging and capture hypothesis from synapse to memory. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 122, 391-423.
- Volkmar, F. R., & Greenough, W. T. (1972). Rearing complexity affects branching of dendrites in the visual cortex of the rat. *Science*, 176(4042), 1445-1447.
- Voss, M. W., Vivar, C., Kramer, A. F., & van Praag, H. (2013). Bridging animal and human models of exercise-induced brain plasticity. *Trends Cogn Sci*, 17(10), 525-544.
- Wang, N., Zhang, Y. H., Wang, J. Y., & Luo, F. (2021). Current understanding of the involvement of the insular cortex in neuropathic pain: a narrative review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 2648.
- Wefelmeyer, W., Puhl, C. J., & Burrone, J. (2016). Homeostatic Plasticity of Subcellular Neuronal Structures: From Inputs to Outputs. *Trends Neurosci*, 39(10), 656-667.
- Woo, N. H., Teng, H. K., Siao, C. J., Chiaruttini, C., Pang, P. T., Milner, T. A., . . . Lu, B. (2005). Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nat Neurosci*, 8(8), 1069-1077.
- Wu, Y., & Mitra, R. (2021). Prefrontal-hippocampus plasticity reinstated by an enriched environment during stress. *Neurosci Res*, 170, 360-363.
- Yang, J., Harte-Hargrove, L. C., Siao, C. J., Marinic, T., Clarke, R., Ma, Q., . . . Hempstead, B. L. (2014). proBDNF negatively regulates neuronal remodeling, synaptic transmission, and synaptic plasticity in hippocampus. *Cell Rep*, 7(3), 796-806.
- Yarmolinsky, D. A., Zuker, Ch. S., & Ryba, N. J. P. (2009). Common sense about taste: from mammals to insects. *Cell*, 139(2), 234-244.
- Yasuda, H., Barth, A. L., Stellwagen, D., & Malenka, R. C. (2003). A developmental switch in the signaling cascades for LTP induction. *Nature neuroscience*, 6(1), 15-16.
- Yiannakas, A. & Rosenblum, K. (2017). The Insula and Taste Learning. *Frontiers in Molecular Neuroscience*.10, 355.
- Zhang, Y., Crofton, E. J., Fan, X., Li, D., Kong, F., Sinha, M., . . . Green, T. A. (2016). Convergent transcriptomics and proteomics of environmental enrichment and cocaine identifies novel therapeutic strategies for addiction. *Neuroscience*, 339, 254-266.

Anexo I

El anexo I corresponde al artículo de investigación en el que se reportan los hallazgos correspondientes a la primera fase del presente estudio. En el cual se exploraron los efectos de la exposición a un ambiente enriquecido sobre la fortaleza de una memoria aversiva, así como la participación de la neurotrofina BDNF en la interacción AE-CAS en la corteza insular.

Referencia:

Gutiérrez-Vera, B., Rivera-Olvera, A. y Escobar, M. L. (2022). Environmental enrichment attenuates conditioned taste aversion through the restoration of BDNF levels in the insular cortex. *Behavioural Brain Research*, 430, 113947.



Short communication

Environmental enrichment attenuates conditioned taste aversion through the restoration of BDNF levels in the insular cortex

Beatriz Gutiérrez-Vera, Alejandro Rivera-Olvera, Martha L. Escobar^{*}

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

ARTICLE INFO

Keywords:

Environmental enrichment
BDNF
Insular cortex
CTA

ABSTRACT

It has been shown that exposure to an enriched environment (EE) can modulate the physiological impact of aversive stimuli in animals, promoting adaptive attitudes, as well as the development of resilience to stressful situations. These changes are known to be related to increased levels of some trophic factors, such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF), which has been considered a regulatory protein for synaptic plasticity in the adult brain. Our previous studies have demonstrated that in the insular cortex (IC), a brain region of the temporal lobe implicated in the acquisition, consolidation, and retention of conditioned taste aversion (CTA) task, BDNF can reverse the CTA memory deficit caused by a protein synthesis inhibitor. Likewise, our research group have also shown that BDNF is required for the maintenance of CTA long-term memory. Here we evaluate the effects of the exposure to an enriched environment on the CTA memory strength, using a weak and strong version of this paradigm. The exposure to an EE for 21 days was able to attenuate the strong-CTA response through the restoration of BDNF levels in the IC of adult rats. These results provide evidence that environmental enrichment is capable of reducing the strength of an aversive memory trace, restoring the BDNF levels in a neocortical region of the adult brain.

Environmental enrichment (EE) refers to special housing conditions that provides environmental complexity with inanimate and social stimulation relative to standard housing conditions [1]. Several studies have shown that EE affects neurotransmitter systems as well as the expression of certain neurotrophic factors [2]. These molecular changes are potentially capable of modifying the performance of individuals in cognitive tasks, as well as the synaptic efficiency of neurons [3], generating a key repertoire for future learning processes [4].

Changes in brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in the brain, have been proposed to be the predominant mechanism by which an EE provides beneficial effects on health and cognition [5]. BDNF is considered an essential protein for the regulation of mechanisms related to long-term memory in the adult brain [6]. Indeed, the exposure of rodents to an EE is able to increase the transcriptional and epigenetic expression of this neurotrophin in the hippocampus [7], while stressful situations downregulate its expression [8].

It has been reported that animals housed in an EE show a lower psychological and physiological impact from stressors when compared with animals housed in standard conditions [9–11], in addition to

modifying the salience of strong aversive stimuli [12–15]. In this context, a previous study carried out by Barbelivien and collaborators, showed that animals reared in enrichment cages, presented a reduction of a conditioned-fear response in the presence of contextual cues when compared to animals reared in isolation [13].

Conditioned taste aversion (CTA) is a well-established learning and memory paradigm in which an animal learns to associate a novel taste with nausea [16]. This paradigm involves a stress-related gustatory experience that is capable of increase the corticosteroid levels when the CS to which a CTA has been developed is subsequently presented [17]. Previous studies from our research group, have shown that the acute infusion of BDNF in the insular cortex (IC), a brain region of the temporal lobe implicated in the acquisition, consolidation and retention of CTA, is able to convert a weak CTA into a strong one, demonstrating that the administration of this neurotrophin in the IC is sufficient to increase an aversive memory trace [16].

So far, it is known that EE acts as a neuroprotective agent to cope with stressful or aversive events [7]. However, to date the mechanisms by which the enriched environment is capable of modifying the salience

^{*} Corresponding author at: División de Investigación y Estudios de Posgrado, Facultad de Psicología, Universidad Nacional Autónoma de México, C.P. 04510 Cd. Mx., Mexico.

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

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2022.113947>

Received 27 November 2021; Received in revised form 7 May 2022; Accepted 24 May 2022

Available online 26 May 2022

0166-4328/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

of aversive stimuli remain unclear. Thus, the aim of the present study was to explore the effects of the exposure to an enriched environment on the conditioned taste aversion memory strength, as well as the role of BDNF in the EE-CTA interaction in the insular cortex of adult rats.

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

For environmental enrichment (EE), rats were caged five hours daily for 21 days [18]. The EE cage (93.3 × 54.3 × 45.7 cm plastic box) was equipped with one large running wheel, two food dispensers and two water bottles, and were enriched with a variety of toys of different shapes, sizes, colors, and textures as well as tunnels and a slippery. Most of the objects and their locations were renewed three times a week to ensure novelty and cognitive stimulation [18]. Each group was conformed of six animals in order to increase the social interaction. Twenty-four hours after the EE exposure [18], animals were trained in conditioned taste aversion.

Animals were placed on a water deprivation schedule, allowing access to water twice a day from a graduated cylinder. Water intake during 10 min drinking interval was recorded for each rat in the course of 3 days. On the day of conditioning, rats were allowed to drink saccharin solution 0.1 % (Sigma, St. Louis, MO) instead of water, and 10 min later, rats received 9.37 ml/kg i.p. either of 0.2 M or 0.1 M solution of LiCl, in order to induce gastric malaise. After three more days of baseline consumption, saccharin solution was presented again to test the aversion. The reduction of saccharin consumption was used as a measure of the strength of aversion (Fig. 1A).

In order to analyze the participation of BDNF in the interaction between EE and CTA, we carried out Western blot assays. Rats were decapitated, and the IC was microdissected 48 h after the aversion test [19]. Two additional groups were used intact (INT n = 6) and EE (n = 6), in which the Western blot assay was performed without previous CTA training. Bilateral IC of each animal was lysed in ice-cold lysis (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 20 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10 % glycerol, 10 % triton) supplemented with 10 mM protease inhibitors (Mini Complete, Roche, Germany); as well as, with phosphatase inhibitors (50 mM NaF, 4 mM Na3VO4, 10 mM NaPPi). Samples of six animals of each group were pooled, performing four independent assays for each pool during the Western blot analysis. Aliquots containing 50 µg of protein for each sample were resolved in 12 % SDS acrylamide gels; blotted electrophoretically and blocked overnight at 4 °C in TBS containing 5 % nonfat

milk and 0.1 % Tween 20. Membranes were incubated with primary antibodies against β-actin (horseradish peroxidase (HRP) conjugate) (1:20,000, Cell Signaling Technology) and BDNF (1:1000, Abcam). The blots were probed with anti-β-actin-HRP conjugate after stripping, which were used as loading controls. Images were captured, and densitometric analysis was performed with Image J software version 1.46r software (NIH, USA).

To examine the effect of the enriched environment on the CTA memory, animals were distributed into the following treatment groups: (1) wCTA (“weak” CTA, n = 16) which received 0.1 M solution of LiCl i. p. on the acquisition day [16]; (2) sCTA (“strong” CTA, n = 16), receiving 0.2 M solution of LiCl i.p. on the acquisition day [16,20]; (3) EE+wCTA (n = 16), which was exposed to enriched environment for 21 days and twenty-four hours later, received the same treatment as the wCTA group [18]; (4) EE+sCTA group (n = 12), which was exposed to enriched environment for 21 days and twenty-four hours later, received the same treatment as the sCTA group.

Saccharin consumption during the CTA-acquisition session did not differ among groups. Nevertheless, a two-way ANOVA revealed significant differences between the groups trained in a strong vs a weak version of the CTA ($F_{1, 56} = 36.13$; $p < 0.001$). Likewise, the saccharin consumption was significantly different among the groups exposed to an enriched environment for 21 days in comparison with the ones kept under standard housing conditions ($F_{1, 56} = 7.329$; $p < 0.01$), along with a significant CTA-treatment x housing condition interaction ($F_{1, 56} = 11.16$; $p < 0.001$). Post-hoc analysis with Fisher’s test showed significant differences in the saccharin consumption between sCTA and wCTA groups during the aversion test ($p < 0.001$) in agreement with our previous studies [16]. Notably, significant differences were also observed between the EE+sCTA and sCTA groups ($p < 0.001$), revealing that enriched environment is capable of attenuating a strong CTA memory. Meanwhile, EE+wCTA and wCTA groups did not differ between them, thus revealing that EE under this condition does not modify a weak aversive memory (Fig. 1B).

To examine whether BDNF was involved in the EE-induced CTA memory attenuation, we analyzed the protein expression levels of BDNF in the insular cortex using Western blot. The IC-BDNF levels were not modified after the exposure to an EE as compared to the intact animals (INT group) in agreement with previous studies [21,22]. On the other hand, the two-way ANOVA revealed significant differences in the IC-BDNF expression between the groups trained in a different version of the CTA (wCTA or sCTA) vs the group without previous CTA training (INT), ($F_{2, 19} = 4.995$; $p < 0.01$), as well as a significant difference between the animals kept in enriched vs standard housing conditions ($F_{1, 19} = 4.641$; $p = 0.04$). Additionally, we also observed a significant

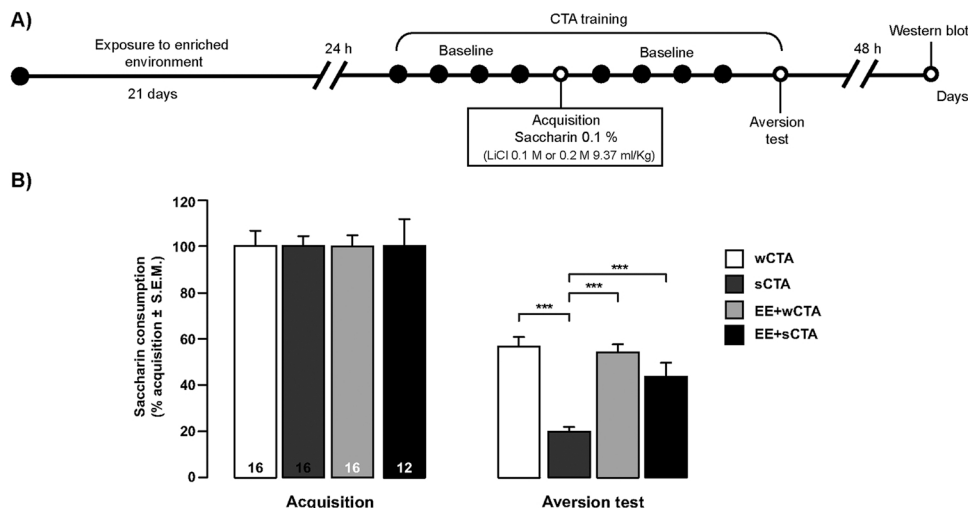


Fig. 1. Environmental enrichment attenuates a strong conditioned taste aversion. A) Diagram of the experimental procedure. B) Saccharin consumption during the acquisition session and the aversion test for wCTA, EE+wCTA, sCTA, and EE+sCTA groups. Note that EE is able to reduce the response to a strong version of CTA, as evidenced by the increasing in the saccharin consumption, while EE does not modify a weak CTA. *** $p < 0.001$.

interaction between these two treatments (CTA vs housing conditions, $F_{1, 19} = 7.486$; $p < 0.01$). The post-hoc analysis with Fisher's test revealed that when the animals were trained in a strong version of CTA they exhibited a decrease in the IC-BDNF expression as compared to the rest of the groups ($p < 0.001$) (Fig. 2). Nevertheless, when the animals were exposed to an EE (EE+sCTA) before the CTA training, the IC-BDNF expression did not present significant changes when compared with the rest of the groups, suggesting that EE is able to restore the BDNF levels in the IC after the CTA acquisition. No significant changes were observed in the IC-BDNF expression when the animals were trained in a weak version of CTA (wCTA group), or when the wCTA was followed by the EE exposure (EE+wCTA group) as compared to the INT group. We carried out a linear regression analysis in order to evaluate the relationship between IC-BDNF levels and the EE-induced CTA memory

attenuation. Linear regression analysis revealed a positive correlation between the BDNF levels and saccharin consumption during the aversion test ($r^2 = 0.85$). Thus, showing that the decrease in BDNF levels correlates with the decrease in saccharin consumption of the sCTA group during the aversion test. While the increase in saccharin consumption observed in the EE+sCTA group after exposure to EE correlates with the restoration of BDNF levels in this group. These results suggest that the restoration of the IC-BDNF levels induced by the exposure to an EE, could be capable of regulating an aversive memory trace, reducing its strength.

The results of the present study demonstrated that animals previously exposed to an enriched environment showed an attenuated aversive response when tested in a strong CTA in comparison with animals kept under standard housing conditions. These findings are consistent with the literature pointing that EE modulates the performance of individuals in cognitive tasks by modifying the salience of aversive stimuli [14,15], as well as reducing stress levels [21,22]. In this regard, an earlier study carried out by Smith and colleagues showed that the exposure of rats to enriched-housing conditions was capable of modifying the salience of the aversive stimulus during a psychoactive-drug-induced CTA protocol [12]. The taste-aversion learning during CTA involves the exposure of animals to a stressful event which is able to increase the corticosteroid levels when the conditioned stimulus is subsequently presented [17].

Several studies have shown that EE is capable of induce neuroprotective effects and reduce maladaptive behaviors caused by various stressors [22,23], promoting adaptive attitudes, as well as the development of resilience to stressful situations [24]. In this regard, EE is able to improve the cognitive function, and reverse the harmful effects of stress when the stressors applied are intense [10]. In agreement with this evidence, our present results show that animals trained in a weak CTA did not show a decrease in the aversion strength after exposure to an EE. These findings are also consistent with the idea that enrichment could fail to exert any effect when the behavioral paradigm involves a weak stressful situation, keeping the system stable and without drastic changes [9,24].

In line with the above, it has been suggested that EE may work via a stress habituation mechanism, whereby repeated exposures to a stressor are able to decrease subsequent coping responses, and in turn, inoculate resilience against future stressors [24]. Indeed, during the enrichment period, animals are repeatedly exposed to novel objects, and this could be comparable to repeated events of mild stress. Since none of these events ever have any aversive outcome, the animals may be primed for excitement and exploration of unfamiliar environment, including objects and social interactions, thus promoting a more emotionally stable behavior [25].

Previous reports have proposed the increased neurotrophic activity in the hippocampus as the primary molecular mechanism for stress-protective effects of EE [1,9,11]. Here, we show that acquisition of a strong CTA decreased the BDNF levels in the insular cortex, however, when the animals were previously exposed to an EE these levels were restored.

In agreement with these results, some studies have shown that the exposure to an enriched housing is capable of restoring the BDNF expression levels in the hippocampus, the amygdala, as well as the prefrontal cortex that were previously decreased in maternally separated [22,26] and chronic stressed rats [27].

Notably, our results show that the attenuated response of a robust CTA caused by exposure to an EE correlates with the restoration of BDNF levels in the IC. In this sense, previous studies from our research group have reported that BDNF is capable of generating a long-lasting potentiation of synaptic efficacy in the IC, as well as modulating the strength of CTA [16,19]. In this regard it is important to consider that variations in the concentrations of this neurotrophin are capable of generating differential and even antagonistic effects [28–31]. Interestingly, the cortical levels of BDNF in the animals trained in a weak CTA were not

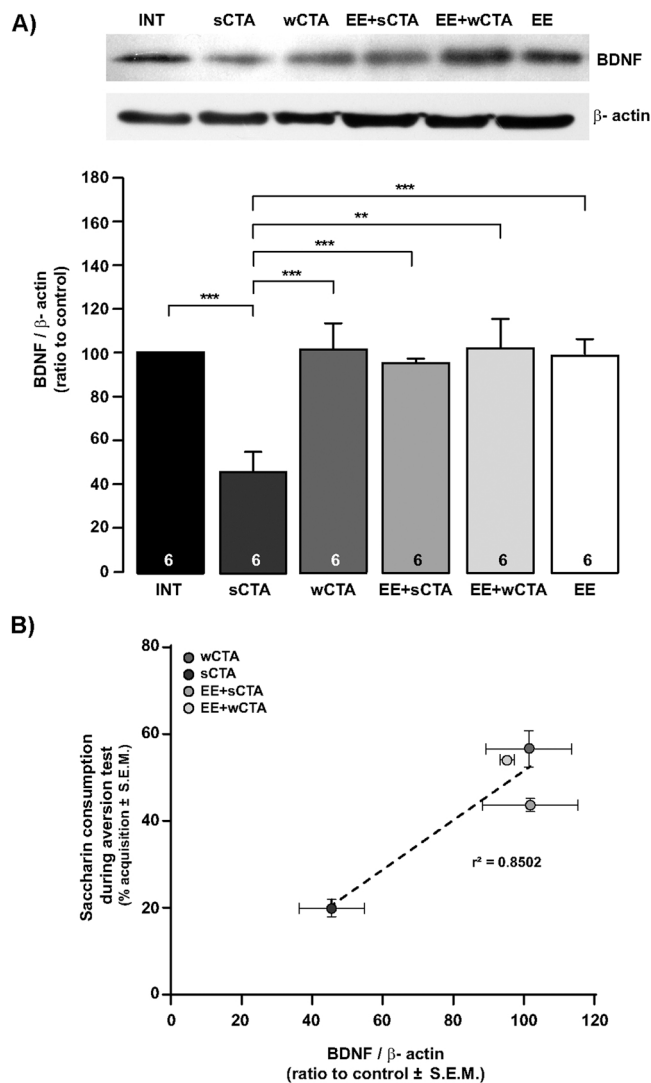


Fig. 2. Exposure to an enriched environment restores the IC BDNF levels on a strong CTA. A) Representative Western blot and densitometric analysis of BDNF protein from EE, EE+wCTA, EE+sCTA, wCTA, sCTA, and INT groups. Note that strong CTA decreases the BDNF expression in the IC as compared to the rest of groups, while the previous exposure to an EE is able to restore the IC-BDNF levels on the EE+sCTA group. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. B) Linear regression plot of saccharin consumption during the aversion test versus BDNF levels for the wCTA, sCTA, EE+wCTA and EE+sCTA groups. The positive correlation shows that the decrease in BDNF levels correlates with the decrease in saccharin consumption of the sCTA group during the aversion test. While the increase in saccharin consumption observed in the EE+sCTA group after exposure to EE correlates with the restoration of BDNF levels in this group.

modified compared to those in the control groups, suggesting that the aversion generated by the acquisition of a weak CTA is in fact less salient to be affected by EE.

Taken together, the results of the present study demonstrate that previous exposure to an EE is able to restore the BDNF levels in a neocortical region of the adult brain affected by the acquisition of an aversive taste memory, as well as modulating the memory trace by reducing its strength.

CRedit authorship contribution statement

Beatriz Gutiérrez: Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Alejandro Rivera:** Methodology, Investigation, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Martha L. Escobar:** Conceptualization, Methodology, Supervision, Writing – original draft, Writing – review & editing, Funding acquisition.

Acknowledgements

This research was supported by Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, UNAM (PAPIIT), México IN205622 and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México CVU-998761.

References

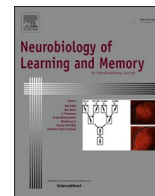
- J. Nithianantharajah, A.J. Hannan, Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system, *Nat. Rev. Neurosci.* 7 (9) (2006) 697–709, <https://doi.org/10.1038/nrn1970>.
- Y.S. Hu, N. Long, G. Pigino, S.T. Brady, O. Lazarov, Molecular mechanisms of environmental enrichment: impairments in Akt/GSK3beta, neurotrophin-3 and CREB signaling, *PLoS One* 8 (5) (2013), e64460, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064460>.
- S.M. Ohline, W.C. Abraham, Environmental enrichment effects on synaptic and cellular physiology of hippocampal neurons, *Neuropharmacology* 145 (Pt A) (2019) 3–12, doi: 10.1016.
- D. Rountree-Harrison, T.J. Burton, C.A. Leamey, A. Sawatari, Environmental enrichment expedites acquisition and improves flexibility on a temporal sequencing task in mice, *Front. Behav. Neurosci.* 12 (2018) 51, <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00051>.
- K. Sano, M. Kawashima, T. Imada, T. Suzuki, S. Nakamura, M. Mimura, K. F. Tanaka, K. Tsubota, Enriched environment alleviates stress-induced dry-eye through the BDNF axis, *Sci. Rep.* 9 (1) (2019) 3422, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39467-w>.
- P. Bekinschtein, M. Cammarota, C. Katche, 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. U. S. A.* 105 (7) (2008) 2711–2716, <https://doi.org/10.1073/pnas.0711863105>.
- B.M. Shilpa, V. Bhagya, G. Harish, M.M. Srinivas Bharath, B.S. Shankaranarayana Rao, Environmental enrichment ameliorates chronic immobilisation stress-induced spatial learning deficits and restores the expression of BDNF, VEGF, GFAP and glucocorticoid receptors, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 76 (2017) 88–100, <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.02.025>.
- N. Kuzumaki, D. Ikegami, R. Tamura, N. Hareyama, S. Imai, M. Narita, K. Torigoe, K. Niikura, H. Takeshima, T. Ando, K. Igarashi, J. Kanno, T. Ushijima, T. Suzuki, M. Narita, Hippocampal epigenetic modification at the brain-derived neurotrophic factor gene induced by an enriched environment, *Hippocampus* 21 (2) (2011) 127–132, <https://doi.org/10.1002/hipo.20775>.
- E.J. Crofton, Y. Zhang, T.A. Green, Inoculation stress hypothesis of environmental enrichment, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 49 (2015) 19–31, <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.11.017>.
- C. Fox, Z. Merali, C. Harrison, Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress, *Behav. Brain Res.* 175 (1) (2006) 1–8, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.08.016>.
- G. Singhal, E.J. Jaehne, F. Corrigan, B.T. Baune, Cellular and molecular mechanisms of immunomodulation in the brain through environmental enrichment, *Front. Cell Neurosci.* 8 (2014) 97, <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00097>.
- J.K. Smith, J.C. Neill, B. Costall, The influence of postweaning housing conditions on drug-induced conditioned taste aversion, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 59 (2) (1998) 379–386, [https://doi.org/10.1016/s0091-3057\(97\)00370-5](https://doi.org/10.1016/s0091-3057(97)00370-5).
- A. Barbelivien, K. Herbeaux, P. Oberling, C. Kelche, R. Galani, M. Majchrzak, Environmental enrichment increases responding to contextual cues but decreases overall conditioned fear in the rat, *Behav. Brain Res.* 169 (2) (2006) 231–238, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.01.012>.
- J.S. Beckmann, M.T. Bardo, Environmental enrichment reduces attribution of incentive salience to a food-associated stimulus, *Behav. Brain Res.* 226 (1) (2012) 331–334, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.09.021>.
- K.M.H. Cavalcante, J.M.M. Bispo, M.F. Souza, Kaal Medeiros, Lcrf Lins, E.R. Santos, J.E.C. Melo, A.M. Gois, Y.S.R. Meurer, P.C. Leal, M. Marchioro, J.R. Santos, Short-term but not long-term exposure to an enriched environment facilitates the extinction of aversive memory, *Behav. Brain Res.* 393 (2020), 112806, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112806>.
- Araceli Martínez-Moreno, F.Rodríguez-Durán Luis, L.Escobar Martha, Brain-derived neurotrophic factor into adult neocortex strengthens a taste aversion memory, *Behav. Brain Res.* 297 (2016) 1–4.
- W.P. Smotherman, J.W. Hennessy, S. Levine, Plasma corticosterone levels during recovery from LiCl produced taste aversions, *Behav. Biol.* 16 (4) (1976) 401–412, [https://doi.org/10.1016/s0091-6773\(76\)91555-8](https://doi.org/10.1016/s0091-6773(76)91555-8).
- M. Leger, E. Paizanis, K. Dzahini, A. Quiedeville, V. Bouet, J.C. Cassel, T. Freret, P. Schumann-Bard, M. Boulouard, Environmental enrichment duration differentially affects behavior and neuroplasticity in adult mice, *Cereb. Cortex* 25 (11) (2015) 4048–4061, <https://doi.org/10.1093/cercor/bhu119>.
- A. Rivera-Olvera, L.F. Rodríguez-Duran, M.L. Escobar, Conditioned taste aversion prevents the long-lasting BDNF-induced enhancement of synaptic transmission in the insular cortex: a metaplastic effect, *Neurobiol. Learn Mem.* 130 (2016) 71–76, <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.01.014>.
- E. Urrieta, M.L. Escobar, Metaplastic regulation of neocortical long-term depression in vivo is sensitive to distinct phases of conditioned taste aversion, *Neurobiol. Learn Mem.* 182 (2021), 107449, <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2021.107449>.
- A. Ashokan, A. Hegde, R. Mitra, Short-term environmental enrichment is sufficient to counter stress-induced anxiety and associated structural and molecular plasticity in basolateral amygdala, *Psychoneuroendocrinology* 69 (2016) 189–196, <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.04.009>.
- A. Hegde, S. Suresh, R. Mitra, Early-life short-term environmental enrichment counteracts the effects of stress on anxiety-like behavior, brain-derived neurotrophic factor and nuclear translocation of glucocorticoid receptors in the basolateral amygdala, *Sci. Rep.* 10 (1) (2020) 14053, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70875-5>.
- M.L. Lehmann, M. Herkenham, Environmental enrichment confers stress resiliency to social defeat through an infralimbic cortex-dependent neuroanatomical pathway, *J. Neurosci.* 31 (16) (2011) 6159–6173, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0577-11.2011>.
- M.A. Smail, B.L. Smith, N. Nawreen, J.P. Herman, Differential impact of stress and environmental enrichment on corticolimbic circuits, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 197 (2020), 172993, <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2020.172993>.
- F. Larsson, B. Winblad, A.H. Mohammed, Psychological stress and environmental adaptation in enriched vs. impoverished housed rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73 (1) (2002) 193–207, [https://doi.org/10.1016/s0091-3057\(02\)00782-7](https://doi.org/10.1016/s0091-3057(02)00782-7).
- Epsilon Dandi, A. Kalamari, O. Touloumi, R. Lagoudaki, E. Nousiopolou, C. Simeonidou, E. Spandou, D.A. Tata, Beneficial effects of environmental enrichment on behavior, stress reactivity and synaptophysin/BDNF expression in hippocampus following early life stress, *Int. J. Dev. Neurosci.* 67 (2018) 19–32, <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2018.03.003>.
- A.M. Ghorbanpour, M. Saboor, R. Panahizadeh, H. Saadati, M. Dadkhal, Combined effects of royal jelly and environmental enrichment against stress-induced cognitive and behavioral alterations in male rats: behavioral and molecular studies, *Nutr. Neurosci.* (2021) 1–12, <https://doi.org/10.1080/1028415X.2021.1909205>.
- C. Cunha, A. Angelucci, A. D'Antoni, M.D. Dobrossy, S.B. Dunnett, N. Berardi, R. Brambilla, Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) overexpression in the forebrain results in learning and memory impairments, *Neurobiol. Dis.* 33 (3) (2009) 358–368, <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.11.004>.
- Y. Ji, Y. Lu, F. Yang, W. Shen, T.T. Tang, L. Feng, S. Duan, B. Lu, Acute and gradual increases in BDNF concentration elicit distinct signaling and functions in neurons, *Nat. Neurosci.* 13 (3) (2010) 302–309, <https://doi.org/10.1038/nn.2505>.
- Y. Wang, T.Y. Zhang, J. Xin, T. Li, H. Yu, N. Li, Z.Y. Chen, Differential involvement of brain-derived neurotrophic factor in reconsolidation and consolidation of conditioned taste aversion memory, *PLoS One* 7 (11) (2012), e49942, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049942>.
- W. Guo, G. Nagappan, B. Lu, Differential effects of transient and sustained activation of BDNF-TrkB signaling, *Dev. Neurobiol.* 78 (7) (2018) 647–659, <https://doi.org/10.1002/dneu.22592>.

Anexo II

El anexo II corresponde al artículo de investigación en el que se reportan los hallazgos correspondientes a la segunda fase del presente estudio. En el cual se exploraron los efectos de la exposición breve a un ambiente enriquecido sobre la fuerza de la memoria aversiva, así como sobre la potenciación de largo plazo (LTP) *in vivo* generada por estimulación de alta frecuencia de la vía Bla-CI.

Referencia:

Gutiérrez-Vera, B., Reyes-García, S. E., & Escobar, M. L. (2023). Brief environmental enrichment elicits metaplasticity on the insular cortex *in vivo* and reduces the strength of conditioned taste aversion. *Neurobiology of Learning and Memory*, 205, 107840.



Short communication

Brief environmental enrichment elicits metaplasticity on the insular cortex in vivo and reduces the strength of conditioned taste aversion

Beatriz Gutiérrez-Vera, Salma E. Reyes-García, Martha L. Escobar*

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



ARTICLE INFO

Keywords:

Environmental enrichment
Insular cortex
CTA
LTP
Metaplasticity

ABSTRACT

Environmental enrichment (EE) is known to improve memory and cognition and modulate the impact of aversive stimuli in animals, promoting the development of resilience to stressful situations. Likewise, it is known that EE can modulate synaptic plasticity as is the case of long-term potentiation (LTP). These findings have been described initially in *ex vivo* preparations, suggesting that the effects of EE are the result of an early modification of the synaptic excitability and transmission. In this regard, it is known that metaplasticity refers to the persistent modification, by previous activity, in the ability to induce synaptic plasticity. Our previous studies have shown that prior training in conditioned taste aversion (CTA) prevents the subsequent induction of LTP in the projection from the basolateral nucleus of the amygdala (Bla) to the insular cortex (IC) in vivo. In addition, we have shown that CTA extinction allows the induction but not the maintenance of IC-LTP of the Bla-IC pathway. Recently, we also showed that prior exposure to environmental enrichment for three weeks reduces the strength of CTA, restoring the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in the IC. The present study aimed to analyze the effects of brief exposure to an enriched environment on the strength of aversive memory, as well as on the in vivo IC-LTP. To do so, adult rats were exposed for seven days to an EE, either before CTA training or LTP induction in the Bla-IC pathway. Our results demonstrate that a seven-day exposure to an enriched environment attenuates the aversive response to a strong CTA and allows the induction but not the maintenance of LTP in the insular cortex. These findings provide evidence that metaplastic regulation in a neocortical region takes part in the mechanisms through which brief exposure to enriched environments attenuates an aversive response.

1. Introduction

In recent years, multiple investigations have focused on the beneficial effects of prolonged exposure to enriched environments on the response of individuals to stressful situations (Smith et al., 1998; Barbelivien et al., 2006; Beckmann & Bardo, 2012; Cavalcante et al., 2020). In this regard, previous studies from our research group have shown that long-lasting exposure to environmental enrichment (EE) is capable of reducing the strength of an aversive memory trace, restoring the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in a neocortical region of the adult brain (Gutiérrez-Vera et al., 2022). Long-term environmental enrichment elicits enduring effects on the adult brain, including altered synaptic plasticity. Most studies of the effect of EE on synaptic efficacy have examined the consequences of very prolonged EE-exposure. Nevertheless, it is unclear whether brief exposure to EE can alter synaptic plasticity (Buschler & Manahan-Vaughan, 2012). Although finding

the optimal time window for an EE intervention is critical for understanding how environmental modifications can change brain function, the effects of brief exposure to an EE during stressful events have been less explored.

Nowadays, it is known that learning-induced neural activity triggers changes in the strength of synaptic connections in the adult brain. These synaptic changes can occur as Hebbian plasticity, such as long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD) (Citri & Malenka 2008; Vitureira & Goda, 2013), or as the mechanisms that regulate them. Metaplasticity refers to the persistent modification, by previous activity, in the ability to induce synaptic plasticity (Abraham, 2008; Hulme et al., 2013; Keck et al., 2017; Abraham & Richter-Levin, 2018; Lee & Kirkwood, 2019; Reyes-García & Escobar, 2021). Metaplasticity is studied by examining the effects of a priming neuronal activity on the outcome of a subsequent plasticity-inducing event (Abraham, 2008; Hulme et al., 2013; Lee & Kirkwood, 2019). A relevant way to induce

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

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

<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2023.107840>

Received 16 March 2023; Received in revised form 20 September 2023; Accepted 4 October 2023

Available online 5 October 2023

1074-7427/© 2023 Elsevier Inc. All rights reserved.

such priming activity is through behavioural events as learning processes. Indeed, accumulated evidence has indicated that metaplasticity contributes to cognitive processes (Hulme et al., 2013; Abraham & Richter-Levin, 2018; Urrieta & Escobar, 2021). In this sense, it is suggested that exposure to an EE for prolonged periods modifies the cellular excitability and synaptic plasticity of the neurons and those physiological changes cause the improvement of cognitive function (Eckert & Abraham, 2012; Ohline & Abraham, 2019). In this regard, mixed results have been obtained, e.g., it has been shown that exposure to an EE can increase the magnitude of LTP in the hippocampus (Irvine et al., 2006; Buschler & Manahan-Vaughan, 2012; Voss et al., 2013; Ohline & Abraham, 2019). In contrast, it has been reported that prior exposure to prolonged EE decreases neural activity in the amygdala during stressful episodes (Nikolaev et al., 2002; Reichmann et al., 2013; Grimm et al., 2016; Lopes et al., 2018).

Previous studies from our research group have shown that conditioned taste aversion (CTA) training, a well-established learning and memory paradigm in which an animal learns to associate a novel taste with nausea, blocks the ability to induce subsequent Bla-IC-LTP generated by either BDNF administration or high-frequency stimulation (HFS) (Rivera-Olvera et al., 2016; Rodríguez-Durán et al., 2011). In addition, we have shown that induction of LTP enhances CTA retention (Escobar & Bermudez-Rattoni, 2000) and slows-down CTA extinction (Rodríguez-Durán et al., 2017). Conversely, when Bla-IC LTD is induced before CTA training, CTA extinction is facilitated, suggesting a bidirectional modulation of CTA extinction by LTP and LTD, (Rivera-Olvera et al., 2016; Rodríguez-Durán et al., 2017). Moreover, we have shown that CTA extinction regulates the subsequent response of the Bla-IC pathway through decreasing basal synaptic transmission (Rivera-Olvera et al., 2018). As mentioned above, we have recently shown that animals previously exposed to an EE for 21 days showed an attenuated aversive response when tested in a strong CTA (Gutiérrez-Vera et al., 2022).

So far, it is known that previous long-term exposure to environmental enrichment causes neuroprotective effects against stressful or aversive events due to changes in the cellular excitability and synaptic plasticity of hippocampal neurons. However, to date, it is unclear whether short-term EE is capable of modifying the salience of aversive stimuli as well as synaptic plasticity in the neocortex. Therefore, the present study aimed to explore the effects of brief exposure to an enriched environment on taste aversion conditioning as well as on the ability to induce *in vivo* LTP on the Bla-IC pathway.

2. Methods

2.1. Animals

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

2.2. Enriched environment

Environmental enrichment (EE) was set as previously described (Gutiérrez-Vera et al., 2022). Briefly, rats were caged for five hours daily for seven days (Abraham et al., 2005). The EE cage (93.3 × 54.3 × 45.7 cm plastic box) was equipped with a running wheel, a variety of toys of different shapes, sizes, colors, and textures as well as tunnels and a slide. The objects were renewed three times a week to ensure novelty and cognitive stimulation (Gutiérrez-Vera et al., 2022). In order to increase social interaction each group was conformed of six animals taken from the same litter (Sztainberg and Chen, 2010; Love et al., 2022). Twenty-four hours after the EE exposure (Abraham et al., 2005; Leger et al.,

2015), animals were trained in conditioned taste aversion or submitted to surgery for electrophysiological recording.

2.3. Conditioned taste aversion

As previously described (Martínez-Moreno et al., 2016; Rivera-Olvera et al., 2016), animals were trained to drink water twice a day from a graduated cylinder, during 10 min trials for three days. On the acquisition session, rats were allowed to drink saccharin solution (0.1 %, Sigma, St. Louis, MO) and 10 min later received 9.37 ml/kg *i.p.* either of 0.1 M or 0.2 M solution of LiCl to induce gastric malaise. After three more days of baseline consumption, saccharin solution was presented again to test the aversion. The reduction of saccharin consumption with respect to acquisition intake was used as a measure of the strength of aversion.

2.4. Electrophysiological procedures

Electrophysiological recordings were performed in anesthetized rats as previously described (Rodríguez-Durán et al., 2011; Rivera-Olvera et al., 2016). Briefly, animals were anesthetized with pentobarbital (50 mg/kg *i.p.*) and given supplemental injections at 1-hour intervals. Body temperature was maintained at 35 °C with a heating pad. IC responses were recorded unilaterally using a monopolar stainless-steel electrode (0.005 in.). Constant current stimulation (20–40 μ A monophasic pulses, 0.01–0.25 ms duration) was provided via a Grass s48 stimulator directly and unilaterally to the Bla by using a stainless-steel bipolar electrode. IC evoked responses were measured by obtaining the field excitatory postsynaptic potential (EPSP) slope measured 1–3 ms after the EPSP onset. During the 20 min baseline period, responses were evoked at 0.05 Hz. LTP was induced by delivering 10 trains of 100 Hz/1 s with an intertrain interval of 20 s. After train delivery, IC evoked responses were collected for 2 additional hours. LTP was calculated as a percentage compared to the mean slope of the field potentials of the entire baseline period before the delivery of HFS.

Input/output (I/O) curves of the baseline synaptic responses in the Bla-IC pathway were assessed to determine the synaptic strength for a range of stimulation intensities in all groups. I/O curves were assessed before baseline stimulation using multiples (1x to 10x) of threshold intensity, which was determined as the stimulation intensity required to produce a 0.1 mV response amplitude (Rodríguez-Durán et al., 2011).

2.5. Experimental design

To examine the effect of a brief exposure to an enriched environment on the CTA memory strength, animals were distributed randomly into the following treatment groups: (1) wCTA (“weak” CTA, $n = 10$), which received 0.1 M; 9.37 ml/Kg, solution of LiCl *i.p.* on the acquisition day to induce a weak aversion (Martínez-Moreno et al., 2016); (2) sCTA (“strong” CTA, $n = 10$), receiving 0.2 M; 9.37 ml/Kg solution of LiCl *i.p.* on the acquisition day to induce a strong aversion (Martínez-Moreno et al., 2016); (3) EE7 + sCTA ($n = 9$) animals were exposed to an enriched environment for seven days and 24 hr later received the same treatment as the sCTA group. Considering the results of our previous study (Gutiérrez-Vera et al., 2022), in the present work we focus only on the CTA strong modality. Three animals from group EE7 + sCTA that became aggressive with the littermates were removed from the study.

In order to examine the effect of a brief exposure to an enriched environment on the ability to induce subsequent *in vivo* LTP in the Bla-IC projection, animals were distributed into the following treatment groups: (1) HFS ($n = 6$), which received high-frequency stimulation (HFS: 10 trains at 100 Hz) capable of inducing IC-LTP (Rivera-Olvera et al., 2016). Animals remained unhandled in a standard cage, prior to induction of LTP; (2) EE7 + HFS ($n = 7$), animals were exposed to an enriched environment for seven days and twenty-four hours later (Gutiérrez-Vera et al., 2022), received a high-frequency stimulation

(HFS: 10 trains at 100 Hz) capable of inducing IC-LTP (Rivera-Olvera et al., 2016).

2.6. Statistics

Two-way ANOVA and Bonferroni's post-hoc tests were performed for behavioral scores. I/O curves relationship was analyzed by comparing nonlinear regression curves. Two-way ANOVA with repeated measures were performed for EPSPs data.

3. Results

3.1. CTA

The group baseline means (\pm S.E.M.) of water intake (in ml) were 12.5 ± 0.22 , 14.80 ± 1.47 and 13.44 ± 0.5 respectively for groups sCTA, wCTA and EE7 + sCTA. Liquid consumption during the acquisition session did not differ among groups. Nevertheless, a two-way ANOVA revealed significant differences during the aversion test ($F_{2, 52} = 8.216$; $p = 0.0008$). Post-hoc analysis with Bonferroni's test showed significant differences in the saccharin consumption between sCTA and wCTA groups during the aversion test ($p < 0.001$) (Fig. 1B), consistently with our previous studies (Gutiérrez-Vera et al., 2022).

3.2. Brief EE exposure attenuates conditioned taste aversion

Exploration of the effects of a seven-day EE exposure on the CTA memory strength showed that a brief enriched environment is capable of attenuating a strong CTA memory. Notably, post-hoc analysis with Bonferroni's test showed significant differences between the EE7 + sCTA and sCTA groups ($p = 0.0003$) and no significant differences between the EE7 + sCTA and wCTA groups, thus revealing the attenuation of the strong memory (Fig. 1B), similarly to the regulation obtained after 21 days of EE exposure in our previous study (Gutiérrez-Vera et al., 2022).

3.3. Brief EE exposure elicits metaplasticity in the insular cortex in vivo

Histological examinations revealed that stimulating and recording electrodes were correctly placed in the BLA and IC, respectively, for all groups (Fig. 2B). Four animals from group EE7 + HFS with inaccurate electrode placement and one animal from the same group that presented signs of sickness were excluded from the analysis. The IC field EPSP consisted of 0.34 ± 0.04 mV (mean \pm S.E.M.) potentials elicited with 300–600 μ A current intensities and displayed an onset at 2–3 ms and a peak at approximately 7–9 ms, with an average slope of 0.15 ± 0.02 (mean \pm S.E.M.), in agreement with previous studies (Rodríguez-Durán et al., 2011; Rivera-Olvera et al., 2018).

Non-linear regression analysis of I/O relationship (Rodríguez-Durán et al., 2011) revealed significant differences between the EE7 + HFS and

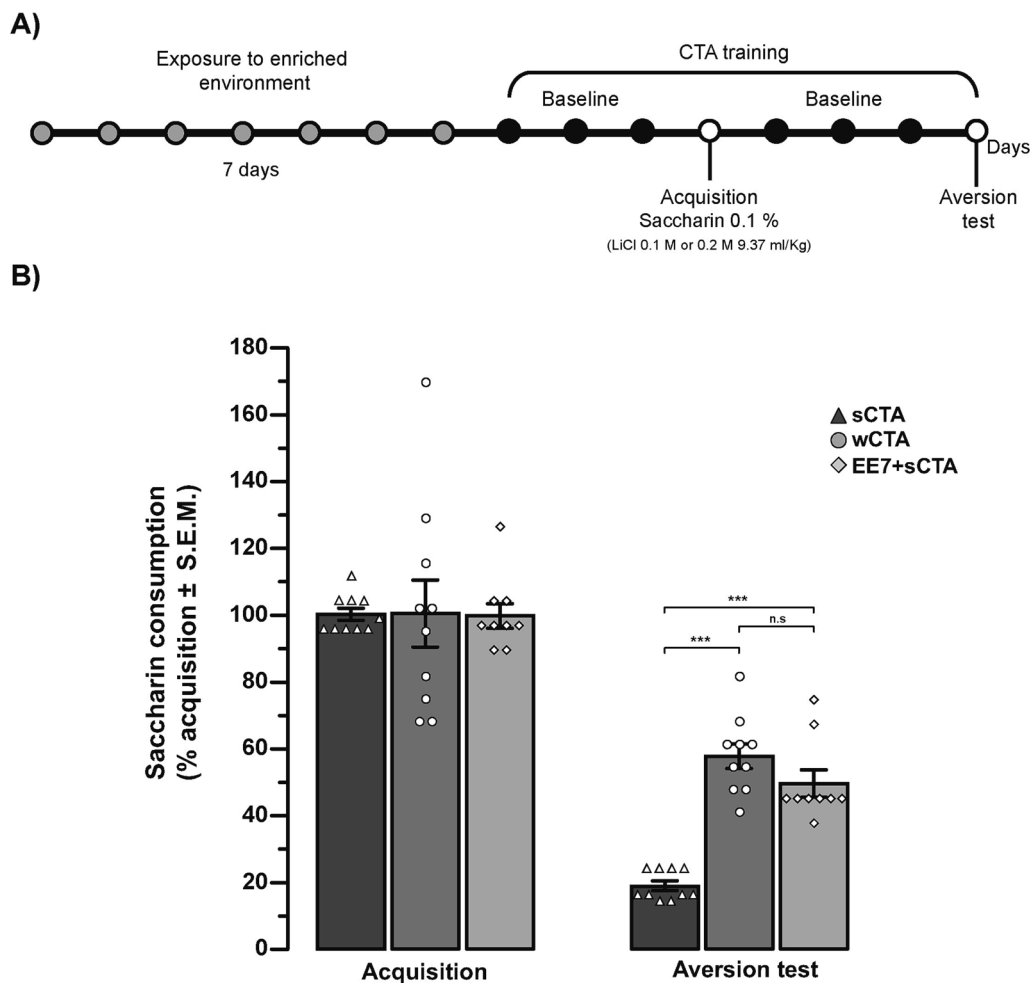


Fig. 1. Brief environmental enrichment exposure attenuates a strong conditioned taste aversion. A) Diagram of the experimental procedure. B) Scatter plots show individual data distribution. Saccharin consumption during the acquisition session and the aversion test for sCTA ($n = 10$), wCTA ($n = 10$) and EE7 + sCTA ($n = 9$) groups. Note that brief EE is able to reduce the response to a strong version of CTA, as evidenced by the increasing in the saccharin consumption. *** $p < 0.001$.

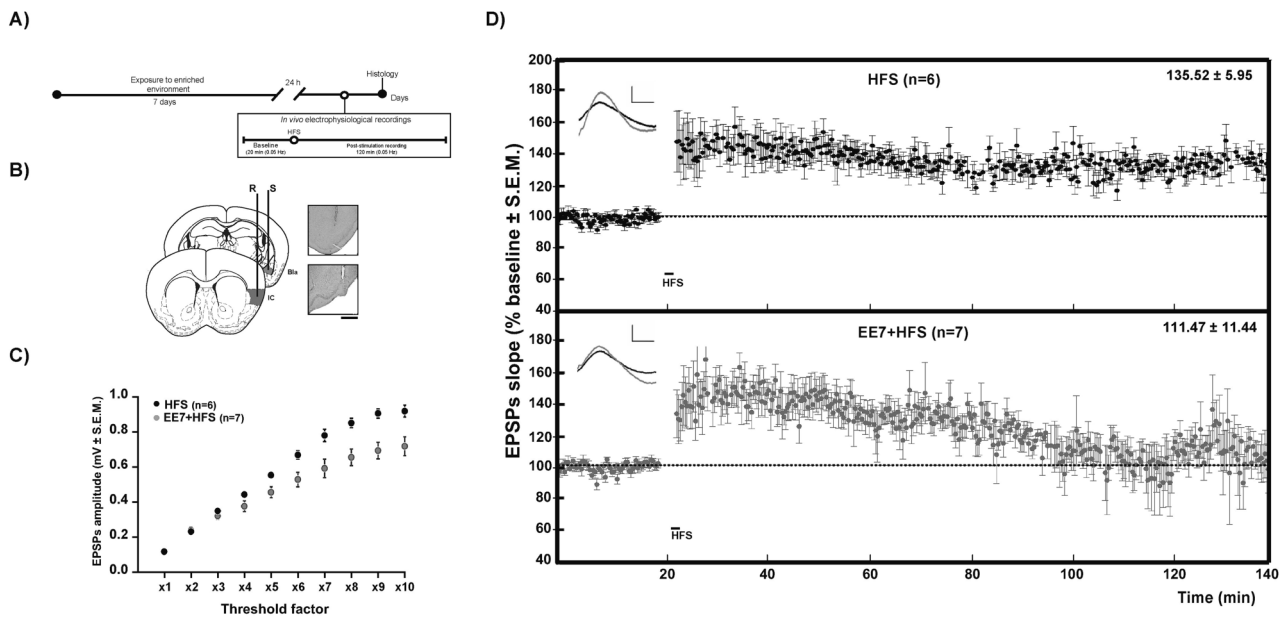


Fig. 2. Brief environmental enrichment allows the induction but not the maintenance of IC-LTP in vivo and modifies the basal excitability of the insular cortex. A) Diagram of the experimental procedure. B) Schematic representation and representative images of electrode placement showing the stimulated (S) and recorded (R) sites in a coronal plane. C) Plot of I/O curves for HFS and EE + HFS groups. Note that EE brief exposure decrements basal synaptic excitability. D) Plot of IC evoked responses from HFS ($n = 6$) and EE7 + HFS ($n = 7$) groups. Note that EE allows the induction but not maintenance of IC-LTP. The top of each graph shows representative mean IC field potentials obtained during baseline (black line) and the last 20 min of recording (gray line) after HFS. The inner numbers show the average EPSPs slope (percent of baseline) from the last 20 min of recording. Dot lines indicate the baseline percentage. Bla: basolateral amygdaloid nucleus; IC: insular cortex; HFS: high-frequency stimulation. Scale bar: 0.5 mV, 10 ms.

HFS groups ($p < 0.0001$). The I/O curve from EE7 + HFS group indicates that brief exposure to an enriched environment decreases the synaptic efficacy of the Bla-IC pathway (Fig. 2C).

As shown in Fig. 2D, the LTP group showed an increment in the EPSPs slope immediately after and during a period of at least two hours after conditioning stimulation. In contrast, group EE7 + HFS showed that EE exposure for 7 days allows the induction but not the maintenance of subsequent LTP, i.e., the increase in synaptic efficiency begins to decay about 50 min after the application of HFS in the Bla-IC projection. Repeated-measures ANOVA analysis for the last 20 min of recordings revealed significant group differences ($F_{1,11} = 7.82$, $p = 0.017$). The percent changes (\pm SEM) in the EPSP slope for the HFS and EE7 + HFS groups were: 135.52 ± 5.95 and 111.47 ± 11 , respectively.

4. Discussion

Enriched environments are capable of modifying the salience of aversive stimuli (Barbelivien et al., 2006; Sampedro-Piquero & Begega, 2017; Clemenson et al., 2018), and it is suggested that cognitive function improvements result from modulation in the cellular excitability and synaptic plasticity (Kempermann, 2019; Ohline & Abraham, 2019). In a previous study, we showed that prior long-term exposure to environmental enrichment can reduce the strength of an aversive response (Gutiérrez-Vera et al., 2022). In the present study, we show that exposure to a brief environmental enrichment reduces the strength of aversion in the CTA task, presumably by the modification of synaptic plasticity in a neocortical region.

In this regard, it has been reported that animals housed in an EE for long periods modify the salience of strong aversive stimuli (Smith et al., 1998; Barbelivien et al., 2006; Beckmann & Bardo, 2012). For instance, Barbelivien and collaborators showed that animals housed in EE presented a reduction in a conditioned-fear response (Barbelivien et al., 2006), and Beckman and Bardo demonstrated that EE reduces the incentive value of a cue associated with reward (Beckmann & Bardo, 2012). Indeed, Smail and collaborators state that an important attribute

of EE is its ability to attenuate aversive stimuli and even reverse them (Smail et al., 2020). Despite the encouraging results regarding the effects of exposure to EE in modifying the salience of stimuli, research on the effects of brief exposures to EE during stressful events have been far less explored. In this context, the results of the present study shed light on the matter showing that a brief environmental enrichment exposure reduces the strength of aversion in the CTA task and modify the synaptic plasticity expression in a neocortical area of the adult brain.

Learning and memory expression rely on synaptic plasticity processes, which in turn are regulated by mechanisms such as metaplasticity, where neurons modulate their synaptic strength changes depending on their previous history of activity. Subtle differences in that history can lead to changes in the expression of synaptic plasticity (Abraham & Richter-Levin, 2018; Lee & Kirkwood, 2019; Urrieta & Escobar, 2021). In this sense, it has been observed that the acquisition of aversive experiences is accompanied by long-lasting modifications in the ability to undergo further synaptic plasticity (Rodríguez-Durán et al., 2011; Rivera-Olvera et al., 2016; Rivera-Olvera, et al., 2018, Urrieta & Escobar, 2021). For instance, it has been observed that prior acquisition of aversive learning modifies the ability to express subsequent LTP and LTD in the hippocampus, as well as in the neocortex (Hirata et al., 2009; Rivera-Olvera et al., 2016; Rivera-Olvera, et al., 2018; Stansley et al., 2018; Urrieta & Escobar, 2021). In this order of ideas our previous studies showed that CTA training modifies the ability to induce subsequent Bla-IC LTP generated either by high frequency stimulation (Rodríguez-Durán et al., 2011; Rodríguez-Durán and Escobar, 2014) or by BDNF administration (Rivera-Olvera et al., 2016). Additionally, we reported that induction of LTP in the Bla-IC projection before CTA training increases the retention of this task (Escobar & Bermudez-Rattoni, 2000; Rodríguez-Durán et al., 2017), while LTD induction facilitates its extinction (Rodríguez-Durán et al., 2017). In addition, our studies show that CTA training occludes the subsequent induction of LTD in a retrieval-dependent manner (Urrieta & Escobar, 2021). Similarly, Haley and collaborators found that LTD in BLA-IC synapses was prevented in CTA-trained mice IC slices (Haley et al., 2020), while Li and

collaborators found a related effect, as cortico-cortical LTD was prevented in CTA-extinction mice IC slices (Li et al., 2016). Moreover, our studies show that extinction training allows the induction but not the maintenance of IC-LTP (Rivera-Olvera et al., 2018). It has also been reported that contextual fear conditioning training reduces the ability to induce hippocampal LTP (Sacchetti et al., 2002; Hirata et al., 2009), while contextual fear extinction converts hippocampal LTD into LTP in a mGlu receptor-dependent manner (Stansley et al., 2018).

Interestingly, here we demonstrated that a brief exposure to an EE allows the induction but not the maintenance of LTP in the Bla-IC pathway. In this regard, it has been demonstrated that EE can reverse previously induced LTP in the hippocampus (Abraham et al. 2002; 2005). Likewise, Qi and collaborators showed that a novelty exploration for 30 min induces a quick and persistent reversion of the hippocampal LTP (Qi et al., 2013), and Irvine and collaborators showed that LTP induced during exposure to an enriched environment is less persistent throughout the days (Irvine et al. 2006). In addition, it has been proved that exposure to novelty events can decrease basal transmission and facilitate a depotentiation event (Kemp & Manahan-Vaughan, 2004; Hong et al., 2011; Dong et al., 2012; Qi et al., 2013). Indeed, Buschler and Manahan-Vaughan suggested that brief periods of EE may trigger metaplastic changes (Buschler & Manahan-Vaughan, 2012).

Similarly, our previous findings have shown that CTA extinction regulates the subsequent response to stimulation of the Bla-IC pathway, i.e., while CTA training increases the basal synaptic transmission, extinction reverses this strengthening, allowing LTP induction but not its maintenance (Rivera-Olvera et al., 2018). Our present results suggest that brief EE exposure could trigger a similar metaplastic mechanism as CTA extinction does. Indeed, the analysis of the I/O curves revealed that basal synaptic transmission of the EE exposed group was decreased compared to the control group, which possibly influences the LTP maintenance, and, as we mentioned above, this mechanism could be underlying the reduction of the aversive memory strength. On this subject, previous studies have demonstrated that behavioral training can induce synaptic modification (Rodríguez-Durán et al., 2011; Rivera-Olvera et al., 2016) and this modification can be observed through modulation of the I/O relationship (Rivera-Olvera et al., 2018; Urrieta & Escobar 2021). Moreover, it has been reported that behavioral-dependent synaptic changes also modify the ability to induce subsequent LTP in the behavioral-related pathway (Hirata et al., 2009; Rodríguez-Durán et al., 2011). The results of the present study show differences between groups HFS and EE7 + HFS I/O curves, showing that EE exposure modifies the synaptic strength of the Bla-IC projection. These data suggest that the EE-dependent modification in the ability to induce IC-LTP could be dependent, at least in part, on previous synaptic weakening of the pathway. Nevertheless, other mechanisms can potentially interfere with the kinetics of the I/O curves and LTP, such as changes in presynaptic function (Ganguly et al., 2000), structural modifications (Ramos-Languren & Escobar, 2013; Martínez-Moreno, et al., 2020), changes in intrinsic excitability (Irvine et al., 2006; Malik & Chattarji, 2012), as well as different levels of neuromodulators (Maity et al., 2015). Taken together, the present results demonstrate that exposure to an EE is able to change the basal synaptic transmission (measured by I/O curves) of the Bla-IC pathway and that this change probably functions like a metaplastic modulator which could explain the reduction of CTA strength.

In summary, the present study showed that brief environmental enrichment attenuates the response to a robust CTA and allows the induction but not the maintenance of LTP in a neocortical region of the adult brain. This observation highlights that environmental manipulations could be used as a modulator for stress-associated memory processes.

CRedit authorship contribution statement

Beatriz Gutiérrez-Vera: Conceptualization, Methodology,

Investigation, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Salma E. Reyes-García:** Methodology, Investigation, Writing – original draft. **Martha L. Escobar:** Conceptualization, Methodology, Supervision, Funding acquisition, Investigation, Writing – original draft, Writing – review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgments

This research was supported by Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (DGAPA-PAPIIT), México IN205622 and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México CVU-998761. We thank Esteban Urrieta-Chávez for their valuable comments on this paper and Dr. Luis F. Rodríguez-Durán, for technical assistance.

References

- Abraham, W. C. (2008). Metaplasticity: tuning synapses and networks for plasticity. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(5), 387–387. PMID: 18401345, 10.1038/nrn2356.
- Abraham, W. C., & Richter-Levin, G. (2018). From Synaptic Metaplasticity to tagging metaplasticity. *Neurobiology of learning and memory*, 154, 1–4. PMID: 30217268 10.1016/j.nlm.2018.08.015.
- Abraham, W. C., Logan, B., Greenwood, J. M., & Dragunow, M. (2002). Induction and experience-dependent consolidation of stable long-term potentiation lasting months in the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 22(21), 9626–9634. PMID: 12417688 10.1523/JNEUROSCI.22-21-09626.2002.
- Abraham, W. C., Mason-Parker, S. E., Irvine, G. I., Logan, B., & Gill, A. I. (2005). Induction and activity-dependent reversal of persistent LTP and LTD in lateral perforant path synapses in vivo. *Neurobiology of learning and memory*, 86(1), 82–90. PMID: 16458543 10.1016/j.nlm.2005.12.007.
- Barbelivien, A., Herbeaux, K., Oberling, P., Kelche, C., Galani, R., & Majchrzak, M. (2006). Environmental enrichment increases responding to contextual cues but decreases overall conditioned fear in the rat. *Behavioural Brain Research*, 169(2), 231–238. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.01.012>. PMID: 16473418.
- Beckmann, J. S., & Bardo, M. T. (2012). Environmental enrichment reduces attribution of incentive salience to a food-associated stimulus. *Behavioural Brain Research*, 226(1), 331–334. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.09.021>. PMID: 21945300.
- Buschler, A., & Manahan-Vaughan, D. (2012). Brief environmental enrichment elicits metaplasticity of hippocampal synaptic potentiation in vivo. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 6, 85. PMID: 23248592 10.3389/fnbeh.2012.00085.
- Cavalcante, K. M. H., Bispo, J. M. M., Souza, M. F., Medeiros, K., Lcfr Lins, E. R., Santos, J. E. C., Melo, A. M., Gois, Y. S. R., Meurer, P. C., Leal, M. M., & Santos, J. R. (2020). Short-term but not long-term exposure to an enriched environment facilitates the extinction of aversive memory. *Behavioural Brain Research*, 393, Article 112806. PMID: 32673706 10.1016/j.bbr.2020.112806.
- Citri, A., & Malenka, R. C. (2008). Synaptic plasticity: Multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, 33(1), 18–41. PMID: 17728696 10.1038/sj.npp.1301559.
- Clemenson, G. D., Gage, F. H., & Stark, C. E. (2018). Environmental enrichment and neuronal plasticity. *The Oxford Handbook of Developmental Neural Plasticity*, 85, 283–284. <https://doi.org/10.1093/oxfordhb/9780190635374.013.13>
- Dong, Z., Gong, B., Li, H., Bai, Y., Wu, X., Huang, Y., ... Wang, Y. T. (2012). Mechanisms of hippocampal long-term depression are required for memory enhancement by novelty exploration. *Journal of Neuroscience*, 32(35), 11980–11990. PMID: 22933783 10.1523/JNEUROSCI.0984-12.2011.
- Eckert, M. J., & Abraham, W. C. (2012). Effects of environmental enrichment exposure on synaptic transmission and plasticity in the hippocampus. *Neurogenesis and neural plasticity*, 165–187. PMID: 22798066 10.1007/7854_2012_215.
- Escobar, M. L., & Bermudez-Rattóni, F. (2000). Long-term potentiation in the insular cortex enhances conditioned taste aversion retention. *Brain research*, 852(1), 208–212. PMID: 10661514. 10.1016/S0006-8993(99)02134-4.
- Ganguly, K., Kiss, L., & Poo, M. M. (2000). Enhancement of presynaptic neuronal excitability by correlated presynaptic and postsynaptic spiking. *Nature neuroscience*, 3(10), 1018–1026. PMID: 11017175 10.1038/79838.
- Grimm, J. W., Barnes, J. L., Koerber, J., Glueck, E., Ginder, D., Hyde, J., & Eaton, L. (2016). Effects of acute or chronic environmental enrichment on regional Fos protein

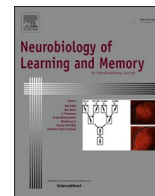
- expression following sucrose cue-reactivity testing in rats. *Brain Structure and Function*, 221(5), 2817–2830. PMID: 26068175 10.1007/s00429-015-1074-z.
- Gutiérrez-Vera, B., Rivera-Olvera, A., & Escobar, M. L. (2022). Environmental enrichment attenuates conditioned taste aversion through the restoration of bdnf levels in the insular cortex. PMID: 35644274 *Behavioural Brain Research*, 113947. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2022.113947>.
- Haley, M. S., Bruno, S., Fontanini, A., & Maffei, A. (2020). LTD at amygdalocortical synapses as a novel mechanism for hedonic learning. *eLife*, 9, e55175. <https://doi.org/10.7554/eLife.55175>. PMID: 33169666.
- Hirata, R., Matsumoto, M., Judo, C., Yamaguchi, T., Izumi, T., Yoshioka, M., & Togashi, H. (2009). Possible relationship between the stress-induced synaptic response and metaplasticity in the hippocampal CA1 field of freely moving rats. *Synapse*, 63(7), 549–556. PMID: 19253399 10.1002/syn.20631.
- Hong, I., Kim, J., Lee, J., Park, S., Song, B., Kim, J., ... Choi, S. (2011). Reversible plasticity of fear memory-encoding amygdala synaptic circuits even after fear memory consolidation. *PLoS One*, 6(9), e24260. PMID: 21949700 10.1371/journal.pone.0024260.
- Hulme, S. R., Jones, O. D., & Abraham, W. C. (2013). Emerging roles of metaplasticity in behaviour and disease. *Trends in neurosciences*, 36(6), 353–362. PMID: 23602195 10.1016/j.tins.2013.03.007.
- Irvine, G. I., Logan, B., Eckert, M., & Abraham, W. C. (2006). Enriched environment exposure regulates excitability, synaptic transmission, and LTP in the dentate gyrus of freely moving rats. *Hippocampus*, 16(2), 149–160. PMID: 16261558 10.1002/hipo.20142.
- Keck, T., Toyozumi, T., Chen, L., Doiron, B., Feldman, D. E., Fox, K., ... Van Rossum, M. C. (2017). Integrating Hebbian and homeostatic plasticity: The current state of the field and future research directions. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1715), 20160158. PMID: 28093552 10.1098/rstb.2016.0158.
- Kemp, A., & Manahan-Vaughan, D. (2004). Hippocampal long-term depression and long-term potentiation encode different aspects of novelty acquisition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(21), 8192–8197. PMID: 15150407 10.1073/pnas.0402650101.
- Kempermann, G. (2019). Environmental enrichment, new neurons and the neurobiology of individuality. *Nature Reviews Neuroscience*, 20(4), 235–245. PMID: 30723309 10.1038/s41583-019-0120-x.
- Lee, H. K., & Kirkwood, A. (2019). Mechanisms of homeostatic synaptic plasticity in vivo. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13, 520. PMID: 31849610 10.3389/fncel.2019.00520.
- Leger, M., Paizanis, E., Dzahini, K., Quiedeville, A., Bouet, V., Cassel, J. C., ... Boulouard, M. (2015). Environmental enrichment duration differentially affects behavior and neuroplasticity in adult mice. *Cerebral cortex*, 25(11), 4048–4061. PMID: 24904072 10.1093/cercor/bhu119.
- Li, W. G., Liu, M. G., Deng, S., Liu, Y. M., Shang, L., Ding, J., ... Xu, T. L. (2016). ASIC1a regulates insular long-term depression and is required for the extinction of conditioned taste aversion. *Nature communications*, 7(1), 13770. PMID: 27924869 10.1038/ncomms13770.
- Lopes, D. A., Souza, T. M., de Andrade, J. S., Silva, M. F., Antunes, H. K., Le Sueur-Maluf, L., ... Viana, M. B. (2018). Environmental enrichment decreases avoidance responses in the elevated T-maze and delta FosB immunoreactivity in anxiety-related brain regions. *Behavioural Brain Research*, 344, 65–72. PMID: 29448033 10.1016/j.bbr.2018.02.012.
- Love, C. J., Gubert, C., Renoir, T., & Hannan, A. J. (2022). Environmental enrichment and exercise housing protocols for mice. *STAR protocols*, 3(4), Article 101689. PMID: 36125931 10.1016/j.xpro.2022.101689.
- Maity, S., Rah, S., Sonenberg, N., Gkogkas, C. G., & Nguyen, P. V. (2015). Norepinephrine triggers metaplasticity of LTP by increasing translation of specific mRNAs. *Learning & Memory*, 22(10), 499–508. PMID: 26373828 10.1101/lm.039222.115.
- Malik, R., & Chattarji, S. (2012). Enhanced intrinsic excitability and EPSP-spike coupling accompany enriched environment-induced facilitation of LTP in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Journal of neurophysiology*, 107(5), 1366–1378. PMID: 22157122 10.1152/jn.01009.2011.
- Martínez-Moreno, A., Rivera-Olvera, A., & Escobar, M. L. (2020). 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. *Neurobiology of Learning and Memory*, 167, Article 107125. PMID: 31770584 10.1016/j.nlm.2019.107125.
- Martínez-Moreno, A., Rodríguez-Durán, L. F., & Escobar, M. L. (2016). Brain-derived neurotrophic factor into adult neocortex strengthens a taste aversion memory. *Behavioural Brain Research SreeTestContent1*, 297, 1–4. PMID: 26433146 10.1016/j.bbr.2015.09.034.
- Nikolaev, E., Kaczmarek, L., Zhu, S. W., Winblad, B., & Mohammed, A. H. (2002). Environmental manipulation differentially alters c-Fos expression in amygdaloid nuclei following aversive conditioning. *Brain Research*, 957(1), 91–98. PMID: 12443984 10.1016/S0006-8993(02)03606-5.
- Ohline S. M., Abraham W. C. (2019). Environmental enrichment effects on synaptic and cellular physiology of hippocampal neurons. *Neuropharmacology*. Feb;145(Pt A):3-12. PMID: 29634984 10.1016/j.neuropharm.2018.04.007.
- Qi, Y., Hu, N. W., & Rowan, M. J. (2013). Switching off LTP: mGlu and NMDA receptor-dependent novelty exploration-induced depotentiation in the rat hippocampus. *Cerebral Cortex*, 23(4), 932–939. PMID: 22490551 10.1093/cercor/bhs086.
- 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(8), 1248–1259. PMID: 23387385 10.1111/ejn.12141.
- Reichmann, F., Painsipp, E., & Holzer, P. (2013). Environmental enrichment and gut inflammation modify stress-induced c-Fos expression in the mouse corticolimbic system. *PLoS One*, 8(1), e54811. PMID: 23349972 10.1371/journal.pone.0054811.
- Reyes-García, S. E., & Escobar, M. L. (2021). Calcineurin Participation in Hebbian and Homeostatic Plasticity Associated with Extinction. PMID: 34220454 *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 226. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.685838>.
- Rivera-Olvera, A., Nelson-Mora, J., Gonsebatt, M. E., & Escobar, M. L. (2018). Extinction of aversive taste memory homeostatically prevents the maintenance of in vivo insular cortex LTP: Calcineurin participation. *Neurobiology of learning and memory*, 154, 54–61. PMID: 29631000 10.1016/j.nlm.2018.04.005.
- 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. PMID: 26854904 10.1016/j.nlm.2016.01.01.
- 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. PMID: 24631390 10.1016/j.bbr.2014.02.049.
- Rodríguez-Durán, L. F., Castillo, D. V., Moguel-González, M., & Escobar, M. L. (2011). Conditioned taste aversion modifies persistently the subsequent induction of neocortical long-term potentiation in vivo. *Neurobiology of learning and memory*, 95(4), 519–526. PMID: 21440652 10.1016/j.nlm.2011.03.003.
- Rodríguez-Durán, L. F., Martínez-Moreno, A., & Escobar, M. L. (2017). Bidirectional modulation of taste aversion extinction by insular cortex LTP and LTD. *Neurobiology of learning and memory*, 142, 85–90. PMID: 28034786 10.1016/j.nlm.2016.12.014.
- Sacchetti, B., Lorenzini, C. A., Baldi, E., Bucherelli, C., Roberto, M., Tassoni, G., & Brunelli, M. (2002). Time-dependent inhibition of hippocampal LTP in vitro following contextual fear conditioning in the rat. *European Journal of Neuroscience*, 15(1), 143–150. PMID: 11860514 10.1046/j.0953-816x.2001.01844.x.
- Sampedro-Piquero, P., & Begega, A. (2017). Environmental enrichment as a positive behavioral intervention across the lifespan. *Current neuropharmacology*, 15(4), 459–470. PMID: 27012955 10.2174/1570159X14666160325115909.
- Smail, M. A., Smith, B. L., Nawreen, N., & Herman, J. P. (2020). Differential impact of stress and environmental enrichment on corticolimbic circuits. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 197, Article 172993. PMID: 32659243 10.1016/j.pbb.2020.172993.
- Smith, J. K., Neill, J. C., & Costall, B. (1998). The influence of postweaning housing conditions on drug-induced conditioned taste aversion. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 59(2), 379–386. PMID: 9476985 10.1016/S0091-3057(97)00370-5.
- Stansley, B. J., Fisher, N. M., Gogliotti, R. G., Lindsley, C. W., Conn, P. J., & Niswender, C. M. (2018). Contextual fear extinction induces hippocampal metaplasticity mediated by metabotropic glutamate receptor 5. *Cerebral Cortex*, 28(12), 4291–4304. PMID: 29136107 10.1093/cercor/bhx282.
- Sztainberg, Y., & Chen, A. (2010). An environmental enrichment model for mice. *Nature protocols*, 5(9), 1535–1539. PMID: 20725068 10.1038/nprot.2010.114.
- Urrieta, E., & Escobar, M. L. (2021). Metaplastic regulation of neocortical long-term depression in vivo is sensitive to distinct phases of conditioned taste aversion. *Neurobiology of learning and memory*, 182, Article 107449. PMID: 33915300 10.1016/j.nlm.2021.107449.
- Vitueira, N., & Goda, Y. (2013). Cell biology in neuroscience: The interplay between Hebbian and homeostatic synaptic plasticity. *Journal of Cell Biology*, 203(2), 175–186. PMID: 24165934 10.1083/jcb.201306030.
- Voss, M. W., Vivar, C., Kramer, A. F., & van Praag, H. (2013). Bridging animal and human models of exercise-induced brain plasticity. *Trends in cognitive sciences*, 17(10), 525–544. PMID: 24029446 10.1016/j.tics.2013.08.001.

Anexo III

El anexo III corresponde a un artículo de investigación que deriva de una colaboración en la que participé durante mis estudios de doctorado, en el cual se reporta la participación de la calcineurina en la extinción del CAS y en la expresión de LTD in vivo en la vía Bla-CI.

Referencia:

Reyes-García, S. E., Gutiérrez-Vera, B., & Escobar, M. L. (2022). Calcineurin requirement for in vivo insular cortex LTD and CTA-extinction. *Neurobiology of Learning and Memory*, 193, 107647.



Calcineurin requirement for *in vivo* insular cortex LTD and CTA-extinction

Salma E. Reyes-García, Beatriz Gutiérrez-Vera, Martha L. Escobar*

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

ARTICLE INFO

Keywords:

Extinction
Long-term depression
Calcineurin
Synaptic Plasticity

ABSTRACT

Currently, it is widely accepted that memory extinction involves the formation of a new associative memory rather than unlearning of the information previously acquired. Nonetheless, the cellular and molecular mechanisms underlying this process are still unclear. In this regard, it has been suggested that while kinases modulate conditioning and LTP, phosphatases are relevant for extinction and LTD. In particular, the protein phosphatase calcineurin (CaN) has been involved in the extinction of some behavioral tasks along with LTD. Indeed, studies of our research group have demonstrated that induction of LTD in the basolateral nucleus of the amygdala (Bla) to the insular cortex (IC) pathway facilitates the extinction of conditioned taste aversion (CTA), while the induction of LTP in this pathway slows it down. In addition, we have shown that the extinction of CTA elicits an increase of CaN. The aim of the present study was to evaluate the participation of calcineurin in the extinction of CTA and in the expression of *in vivo* LTD in the Bla-IC pathway. For this purpose, we chemically inhibited calcineurin in the IC of adult male Wistar rats, either during CTA-extinction or thirty minutes after LTD induction in the Bla-IC pathway. Our results show that calcineurin inhibition slows down the CTA-extinction and blocks the maintenance of LTD. Furthermore, we show that CaN levels increase after LTD induction. These findings support the idea that calcineurin is a key molecular actor for both CTA extinction and LTD expression in the IC, a highly relevant neocortical area for the processing of aversively motivated learning tasks, suggesting that both processes are associated at a molecular level.

1. Introduction

In recent years the exploration of the cellular and molecular mechanisms underlying extinction (i.e., the reduction of a previously acquired behavior) has received increasing attention. Long-term depression (LTD), the activity-dependent decrement of the synaptic efficacy, has been proposed as the underlying mechanism for extinction (Klavir et al., 2017; Li et al., 2016a; Saito et al., 2012; Zhang et al., 2011; Hong et al., 2009; Citri and Malenka, 2008; Abraham, 2008; Kim et al., 2007; Dunning and During, 2003; Lin et al., 2003a). Nowadays, it is widely accepted that kinases and phosphatases have important roles for the expression of synaptic plasticity and have also been linked to learning and memory processes (Citri and Malenka, 2008; Abraham, 2008; Dunning and During, 2003). In particular, protein phosphatases activity has been associated with both LTD and extinction of diverse learning paradigms (Rich et al., 2019; Wang et al., 2019; Zhu et al., 2017; Fuente et al., 2014; Nicholls et al., 2008; Lin et al., 2003b; Lin et al., 2003a). In this sense, calcineurin (CaN), a Ca^{2+} /calmodulin-

dependent serine/threonine protein phosphatase, has been closely associated with both phenomena (Reyes-García and Escobar, 2021; Tarasova et al., 2018; Rusnak and Mertz, 2000). Disrupting CaN activity via inhibition and through knock-out strategies impairs the expression of LTD and depotentiation in the hippocampus and the amygdala (Rich et al., 2020; Rich et al., 2019; Lin et al., 2003b; Lin et al., 2003a). Similarly, the activity of this phosphatase has been linked to the extinction of conditioned fear, spatial memory and drug-seeking behavior (Rich et al., 2020; Rich et al., 2019; Wang et al., 2019; Zhu et al., 2017; Fuente et al., 2014; Nicholls et al., 2008).

Conditioned taste aversion (CTA) is a well-established learning and memory paradigm in which an animal acquires aversion to a novel taste when it is associated with nausea (Bermúdez-Rattoni, 2014; Bernstein and Koh, 2007; Escobar and Bermúdez-Rattoni, 2000). The insular cortex (IC) is a region that lies in the temporal neocortex and has been proven to be critical for the induction, maintenance, and retrieval of aversively motivated learning tasks, like CTA (Yiannakas et al., 2021; Kayyal et al., 2019; Gehrlach et al., 2019; Yiannakas and Rosenblum,

* Corresponding author at: División de Investigación y Estudios de Posgrado, Facultad de Psicología, Universidad Nacional Autónoma de México, C.P. 04510 Cd. Mx, México.

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

<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2022.107647>

Received 18 February 2022; Received in revised form 28 May 2022; Accepted 3 June 2022

Available online 6 June 2022

1074-7427/© 2022 Elsevier Inc. All rights reserved.

2017; Li et al., 2016a). The IC is the last relay of the gustatory pathway, receiving gustatory, aversive, and visceral information from the basolateral amygdala (Bla) (Rivera-Olvera et al., 2016; Bermúdez-Rattoni, 2014; Bernstein and Koh, 2007). The IC consists of the granular, dysgranular and agranular subdivisions that are highly interconnected (Maffei et al., 2012). The IC is also divided into the anterior (aIC), medial (mIC) and posterior (pIC) subregions (Gehrlach et al., 2020; Gogolla, 2017). The mIC is known to contain the gustatory cortex (Gehrlach et al., 2020), and it receives more excitatory inputs from the Bla than the pIC and aIC (Gehrlach et al., 2020). In addition, it has been described that the Bla heavily projects to the granular and dysgranular subdivisions (Gogolla, 2017).

Indeed, we have shown that LTP and LTD can be evoked in the Bla-IC pathway (Rodríguez-Durán et al., 2017; Escobar and Bermúdez-Rattoni, 2000), and that IC-LTP promotes CTA retention (Escobar and Bermúdez-Rattoni, 2000) while LTD induction facilitates the CTA extinction (Rodríguez-Durán et al., 2017).

More recently, we demonstrated that CTA extinction training increases the CaN expression in the IC (Rivera-Olvera et al., 2018). Considering the above, the aim of the present study was to evaluate the effects of CaN inhibition on CTA extinction as well as in the expression of *in vivo* LTD in the Bla-IC projection.

2. Methods

2.1. Animals

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

2.2. Cannulae implantation

Using a previously described procedure, animals were bilaterally implanted on the IC with stainless steel guide cannulae (AM Systems, USA) at coordinates: AP + 1.2 mm, ML \pm -5.5 mm, DV -4.5 mm (Paxinos & Watson, 2013), the injector was placed 2 mm under the cannulae so it reached the medial dysgranular IC (Rodríguez-Serrano et al., 2014; Moguel-González et al., 2008). 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). Animals were allowed to recover for 1 week after surgery. Histological analysis was performed on all groups to verify the injector tip location.

2.3. Conditioned taste aversion

Animals were placed on a water deprivation schedule, allowing access to water twice a day from a graduated cylinder. Water intake during 10 min drinking interval was recorded for each rat over 3 days. On the day of conditioning, rats were allowed to drink saccharin solution 0.1% (Sigma, St. Louis, MO) instead of water, and 10 min later, rats were injected *i.p.* with LiCl (JT Baker, USA) (0.2 M; 9.37 ml/kg) to induce gastric malaise. After two more days of baseline consumption, saccharin solution was presented again to test the aversion. The reduction of saccharin consumption was used to measure the aversion strength. During the extinction phase, in nine extinction trials (one every other day over eighteen days) saccharin solution was presented in the absence of LiCl to the groups indicated below.

2.4. Electrophysiological procedures

Electrophysiological recordings were performed in anesthetized rats

as previously described (Rivera-Olvera et al., 2016; Rodríguez-Durán et al., 2011; Escobar et al., 1998). Briefly, animals were anesthetized with pentobarbital (50 mg/kg *i.p.*) and given supplemental injections at 1 h intervals. Body temperature was maintained at 35 °C with a heating pad. IC responses were recorded unilaterally at coordinates AP + 1.2 mm, ML \pm -5.5 mm, DV -6.5 mm by using a monopolar stainless-steel electrode (AM Systems, USA). Constant current stimulation (300–600 μ A monophasic pulses, 0.25 ms duration) was provided via direct and unilateral stimulation of the Bla at coordinates: AP -2.8 mm, ML -5.0 mm, -8.5 mm \pm 0.2 (Paxinos & Watson, 2013) by using a stainless-steel bipolar electrode. IC evoked responses were measured by obtaining the field excitatory postsynaptic potential (EPSP) slope measured 1–3 ms after the EPSP onset. During the 20 min baseline period, responses were evoked at 0.05 Hz. LTD was induced by delivering 900 trains at 1 Hz (Rodríguez-Durán et al., 2017). After train delivery, IC evoked responses were collected for two hours at 0.05 Hz. LTD was calculated as a percentage of change relative to the mean slope of field potentials before conditioning stimulation.

2.5. Experimental design

To examine the effect of CaN inhibition on CTA-extinction, animals were distributed into the following treatment groups: 1) EXT + FK506 group (n = 9), which received an intracortical administration of the selective CaN inhibitor, FK506 (Cell Signaling, Netherlands) (10 μ g/1.6 μ l of 20% DMSO, 0.8 μ l per hemisphere, at 0.5 μ l/min) (Lin et al., 2003a; Sachser et al., 2016) 30 min before the second CTA extinction session; 2) EXT + DMSO group (n = 11), which received an intracortical administration of the FK506 vehicle (1.6 μ l of 20% DMSO, 0.8 μ l per hemisphere, at 0.5 μ l/min) (Lin et al., 2003a) 30 min before the second CTA extinction session; 3) EXT group (n = 12), which was trained in CTA including the extinction procedure, but did not receive the drug nor its vehicle.

To determine the effect of CaN inhibition on LTD expression, animals were distributed into the following treatment groups: 1) LTD + FK506 group (n = 7): which received low-frequency stimulation (900 trains at 1 Hz; each train contains 5 pulses of 250 μ s duration at 250 Hz) capable of inducing LTD (Rodríguez-Durán et al., 2017); 30 min later, they received an intracortical administration of FK506 (10 μ g dissolved in 1.6 μ l of 20% DMSO, 0.8 μ l at 0.5 μ l/min) (Lin et al., 2003a). 2) LTD + DMSO group (n = 6), this group received low-frequency stimulation in order to induce LTD, 30 min later, they received an intracortical administration of the FK506 vehicle (0.8 μ l of 20% DMSO at 0.5 μ l/min) (Lin et al., 2003a). 3) LTD group (n = 7): which received low-frequency stimulation in order to induce LTD but did not receive drug administration. 4) FK506 group (n = 4): which remained under the baseline stimulation and received an intracortical administration of FK506. Input/output (I/O) curves of the baseline synaptic responses in the BLA-IC pathway were assessed to determine the synaptic strength for a range of stimulation intensities in all groups. I/O curves were assessed before baseline stimulation using multiples (1x to 10x) of threshold intensity, that was determined as the stimulation intensity required to produce a 0.1 mV response amplitude.

2.6. Western blot procedure

In order to analyze the expression of the protein phosphatase calcineurin after LTD induction, an additional SHAM group was obtained (n = 6), which did not receive either LFS nor the FK506 infusion, and we carried out Western blot assays. Rats were decapitated, and the IC was microdissected immediately after the electrophysiological procedures. Unilateral IC of each animal was lysed in ice-cold lysis buffer (Thermo Scientific, USA) (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 20 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10% glycerol, 10% triton) supplemented with 10 mM protease inhibitors (Mini Complete, Roche, Germany). Aliquots containing 50 μ g of protein for each sample were resolved in 12% SDS acrylamide gels; blotted

electrophoretically and blocked overnight at 4 °C in TBS containing 5% nonfat milk and 0.1% Tween 20. Membranes were incubated with primary antibodies against β -actin (horseradish peroxidase (HRP) conjugate) (1:15 000, Cell Signaling Technology) and calcineurin (1:5000, #610259, BD Biosciences, New Jersey, USA) and incubated overnight at 4 °C. The blots were probed with anti- β -actin-HRP conjugate after stripping, which was used as loading control. Images were captured, and densitometric analysis was performed with Image J software version 1.46r software (NIH, USA).

2.7. Statistics

Two-way repeated-measures ANOVA and post-hoc Fisher tests were performed for behavioural scores. I/O curves relationship was analysed by comparing nonlinear regression curves. EPSPs data were submitted to a repeated-measures ANOVA and post-hoc Fisher's test. Western blot data was analysed by Kruskal-Wallis's test and post-hoc analysis with Dunn's multiple comparisons.

3. Results

As revealed by histological examinations, microinjectors as well as stimulating and recording electrodes were correctly located for all groups (Fig. 1).

3.1. CaN inhibition slows-down CTA-extinction

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): 17.56 ± 0.99 , 15.31 ± 0.72 and 16.06 ± 0.63 for the EXT, EXT + DMSO and EXT + FK506 groups, respectively. As shown in Fig. 1, during retention trials (extinction sessions), repeated measures ANOVA revealed significant differences among groups $F_{2,29} = 5.425p < 0.001$. Post-hoc analysis with Fisher's test showed that EXT + FK506 group had a significant modification in the retention trials, as indicated by the saccharin consumption, when compared with the rest of groups during sessions 3 to 9 ($p < 0.001$). By session 10, the EXT + FK506 group no longer showed significant differences with the rest of the groups. There were no differences between groups on the first and second retention trials, indicating that all of them showed a maximum aversion and, therefore, a plateau effect. The present results clearly show that calcineurin inhibition by FK506 in the IC impairs CTA-extinction.

3.2. CaN inhibition impairs IC-LTD expression

The IC field EPSP consisted of 0.34 ± 0.04 mV (mean \pm S.E.M.) potentials elicited with 300–600 μ A current intensities and displayed an onset at 2–3 ms and a peak at approximately 7–9 ms, with an average slope of 0.15 ± 0.02 (mean \pm S.E.M.), in agreement with previous studies (Rivera-Olvera et al., 2018; Rodríguez-Durán et al., 2017).

LFS in the Bla successfully induced LTD in the IC as previously shown (Rodríguez-Durán et al., 2017). The IC field EPSPs showed a decrement immediately after and during a period of at least 2 h after conditioning stimulation. As shown in Fig. 2 (LTD + FK506), *in vivo* LTD magnitude was reduced by the administration of the CaN inhibitor, FK506, as compared with vehicle (LTD + DMSO) and the LTD control groups. Repeated-measures ANOVA analysis for the last 20 min of recordings

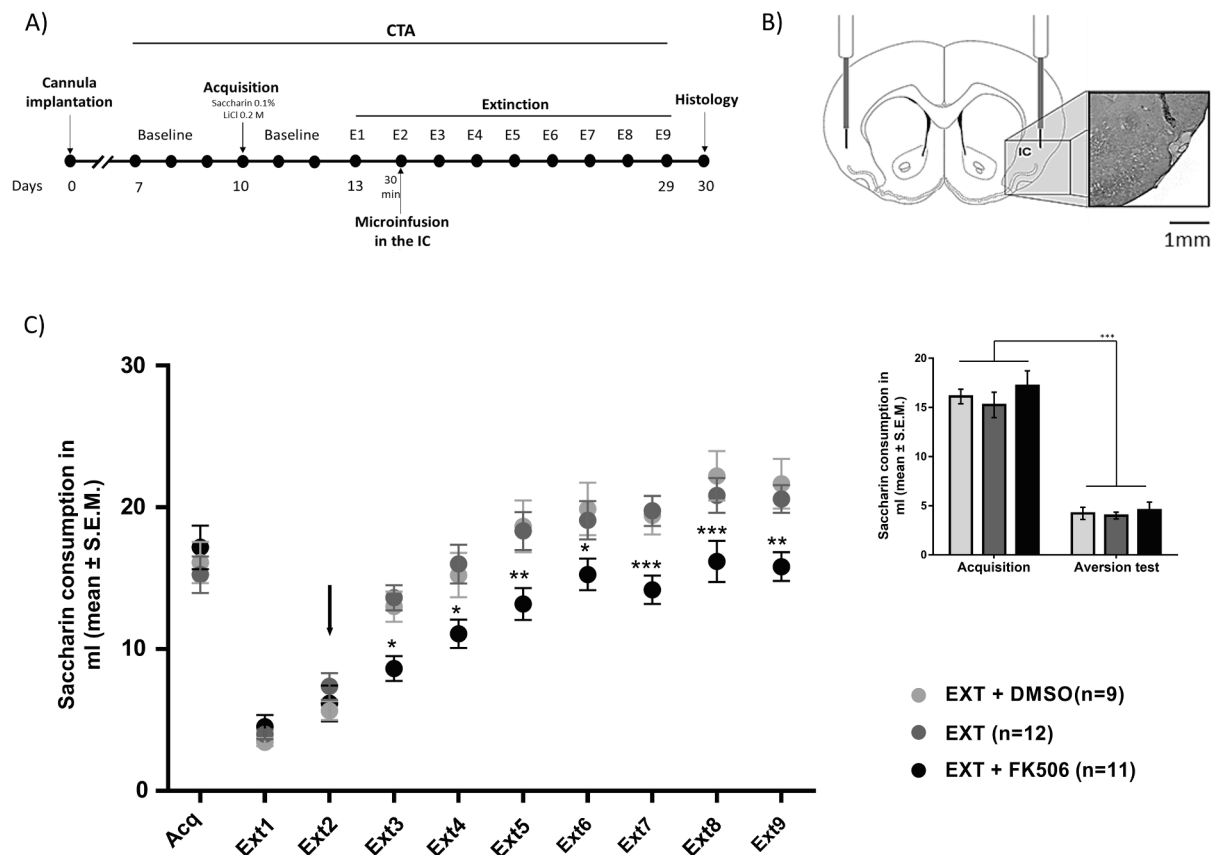


Fig. 1. Calcineurin inhibition slows-down CTA-extinction. A) Diagram of the experimental procedure for CTA-extinction. B) Schematic representation and representative image in a coronal plane of cannulae and injector placement in the IC. C) Saccharin consumption (ml \pm S.E.M.) during the extinction process over the course of nine extinction trials (E1-E9). Arrow indicates the time of FK506 or DMSO infusion. The inset shows the saccharin consumption (ml \pm S.E.M.) for the acquisition session and the aversion test for all groups. * $p < 0.01$ ** $p < 0.001$ *** $p < 0.0001$.

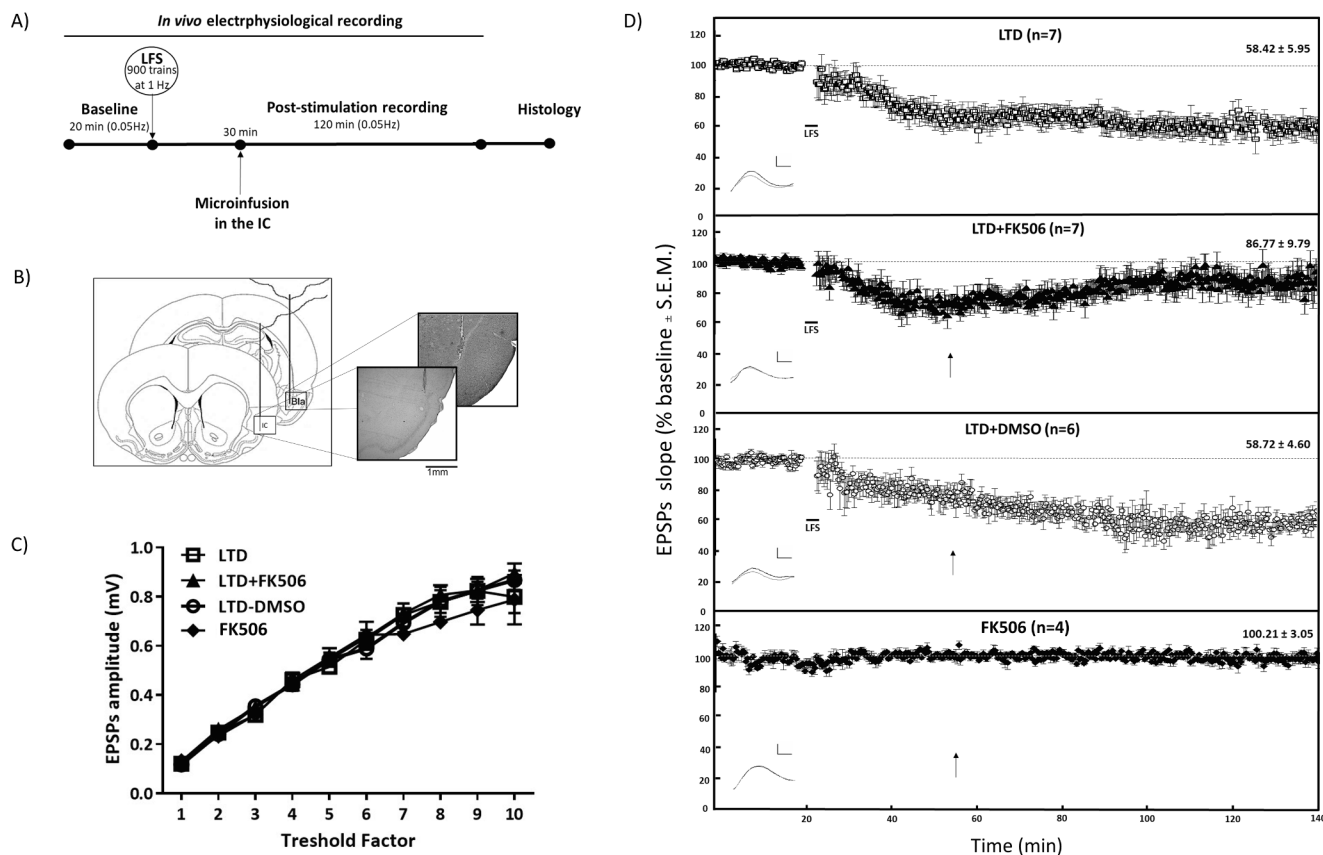


Fig. 2. Calcineurin inhibition blocks the maintenance of IC-LTD. A) Diagram of the experimental procedure for electrophysiology. B) Schematic representation and representative image of the electrode placement showing stimulated (S) and recorded (R) sites in a coronal plane. C) Plot of I/O curves for LTD, LTD + FK506, LTD + DMSO and FK506 groups. D) Plot of IC evoked responses from LTD, LTD + FK506, LTD + DMSO and FK506 groups. Note that CaN inhibition decreases the magnitude of IC-LTD. Representative traces of IC field potentials obtained pre-LFS stimulation (black) and at the last 20 min of the recording (gray) are shown. The inner numbers show the average EPSPs slope (percent of baseline) from the last 20 min of recording. Arrows indicate the time of FK506 or DMSO infusion. Dot lines indicate the baseline percentage. Bla: basolateral amygdaloid nucleus; IC: insular cortex; LFS: low-frequency stimulation. Scale bar: 0.5 mV, 10 ms.

revealed significant group differences ($F_{2, 1003} = 7.75, p = 0.004$). Post-hoc analysis with Fisher's test showed significant differences between the LTD + FK506 group and the control groups ($p < 0.001$). The percent changes (\pm SEM) in the EPSP slope for the LTD, LTD + DMSO and LTD + FK506 groups were: 58.42 ± 5.95 , 58.72 ± 4.60 and 86.77 ± 9.79 , respectively. FK506 group showed that FK506 does not produce any change in the synaptic efficacy itself.

3.3. CaN level is augmented after LTD induction

Since we have shown that CaN levels are increased after CTA-extinction, we performed a Western blot analysis to examine the levels of CaN in the insular cortex after LTD induction.

As shown in Fig. 3, Western Blot analysis showed that LTD increases CaN levels in the insular cortex. There was a significant increase in CaN levels both in the LTD + DMSO group and in the LTD + FK506 group compared to the SHAM group (Kruskal-Wallis; $p = 0.0004$). No significant differences were found between the LTD + DMSO and LTD + FK506 groups (Fig. 3), indicating that FK506 inhibits CaN without affecting its availability.

3.4. I/O relationship

Non-linear regression analysis of I/O relationship (Rodríguez-Durán et al., 2011) revealed no significant differences among groups (Fig. 2C).

4. Discussion

The cellular and molecular mechanisms underlying extinction are still unclear. Nevertheless, LTD has been proposed as the cellular process for extinction learning (Li et al., 2016a; Saito et al., 2012; Hong et al., 2009; Citri and Malenka, 2008; Abraham, 2008; Kim et al., 2007; Dunning and Daring, 2003; Lin et al., 2003a). At the molecular level, phosphatases, such as calcineurin, have been closely associated with LTD induction, as well as with depotentiation and the extinction of diverse learning paradigms (Rich et al., 2020; Wang et al., 2019; Zhu et al., 2017; Fuente et al., 2014; Nicholls et al., 2008; Lin et al., 2003b; Lin et al., 2003a).

In this sense, our previous findings have shown that LTD induction facilitates the CTA extinction (Rodríguez-Durán et al., 2017). Similarly, we have shown that CTA extinction training increases the CaN expression in the IC (Rivera-Olvera et al., 2018). The present study results show that the administration of FK506 in the IC impairs the expression of CTA-extinction, slowing it down. In this regard, previous studies have shown that systemic inhibition of CaN in the lateral amygdala or hippocampus blocks the extinction of conditioned fear (Almeida-Correa et al., 2015; Fuente et al., 2014; Lin et al., 2003b). Likewise, its effect has been shown in spatial memory tasks (Shaw et al., 2012), and in an object recognition paradigm through chronic systemic administrations of FK506 (Sachser et al., 2016). The FK506 binds to the endogenous protein FKBP12 with high affinity (0.4 nM) thus forming a complex that results in CaN inhibition (Liang et al., 1999). For *in vivo* studies, concentrations around $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, like those used in the present study, are commonly used to inhibit CaN activity in subcortical areas (Lin et al.,

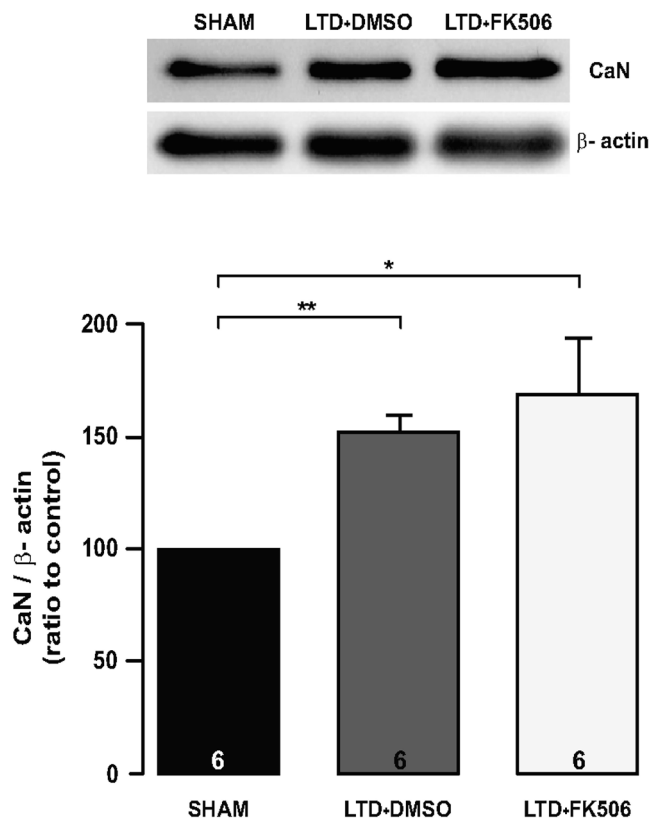


Fig. 3. LTD induction increases CaN levels. Representative Western blots and densitometric analysis in percentage with respect to the loading control for the levels of CaN of the IC in each group (SHAM, LTD + DMSO and LTD + FK506). Note that LTD increases CaN levels in IC. * $p = 0.01$, ** $p = 0.005$.

2003a; Almeida-Correia et al., 2015, Rich et al., 2020).

It should be noted that the effects observed in the present study were generated with only one intracortical administration of the CaN inhibitor prior to the second extinction session. These effects are significant from the third extinction session and are conserved throughout the remaining seven sessions. This is remarkable since the long-term effects of CaN inhibition using the same drug had only been described with its chronic and systemic administration (Sachser et al., 2016; Almeida-Correia et al., 2015). Thus, our results show for the first time that a single administration of FK506 in a neocortical area is sufficient to elicit a long-term effect on the extinction memory of an aversive task in adult subjects.

In addition to the behavioral findings, our results show that CaN inhibition blocks the maintenance of *in vivo* LTD in the Bla-IC pathway, which is essential for the formation, maintenance, and retrieval of aversive taste memories (Yiannakas et al., 2021; Kayyal et al., 2019; Gehrlach et al., 2019). In agreement with this, experimental evidence in the hippocampus and amygdala has indicated that calcineurin actively participates during the expression of LTD (Zhu et al., 2017; Lin et al., 2003a; Zeng et al., 2001; Mulkey et al., 1994).

In this sense, and since our previous results show that CaN levels increase in IC after CTA extinction (Rivera-Olvera et al., 2018), we measured the levels of this phosphatase after induction of LTD in the Bla-IC pathway. Remarkably, these results show that CaN levels also increase after LTD induction, indicating that CaN seems to be essential for both CTA extinction and LTD expression in the Bla-IC pathway. It should be noted that no significant differences were observed between the LTD + DMSO and LTD + FK506 groups, which indicates that, as previously reported (Williams and Johnson, 2021; Li et al., 2016b; Kissinger et al., 1995), FK506 inhibits CaN without affecting its availability.

It is worth mentioning that the recordings of LTD as well as the

administration of the CaN inhibitor were made in the dysgranular subdivision of the mIC, which, as mentioned above, receives numerous projections from the Bla (Gehrlach et al., 2020, Gogolla, 2017). In this sense, the present results show that the inhibition of CaN in the dysgranular subdivision of the mIC affects the extinction of CTA and the expression of LTD.

The mechanisms through which CaN act on the extinction process are not yet fully understood. However, the results presented here along with the research described above allow us to suggest possible cellular mechanisms involved both in CTA-extinction as in the expression of LTD of the Bla-IC pathway. In this sense, it is known that low levels of Ca^{2+} activate CaN, which dephosphorylates the inhibitor 1 (I-1), inactivating it, which in turn generates the protein phosphatase 1 (PP1) activation. PP1 then dephosphorylates CaMKII inactivating it. Additionally, CaN is capable of dephosphorylating AMPA receptors, promoting their endocytosis. Other targets of CaN are some transcription factors such as N-FAT and CREB (Reyes-García and Escobar, 2021; Tarasova et al., 2018; Dunning and During, 2003; Groth et al., 2003). Together, these processes would promote the expression of LTD in the Bla-IC pathway that presumably underlies the expression of CTA-extinction.

On the other hand, when CaN is inhibited, the I-1 could exert its action on PP1 and thus inhibit it. In this scenario, CaMKII activation is promoted, allowing its action through the insertion of AMPA receptors in the postsynaptic membrane, as well as the activation of transcription factors such as CREB, thus hindering the synaptic depression. CaMKII in the IC is primarily known for its role on the maintenance of both LTP and the CTA memory trace (Juárez-Muñoz et al., 2017; Adaikkan and Rosenblum, 2015). However, it has been shown that CaMKII can also be activated by LFS. CaMKII activity in this case elicits the phosphorylation of the GluA1-S567, thus promoting the removal of AMPA receptors towards extra-synaptic sites, which in turn promotes LTD (Coultrap et al., 2014; Woolfrey et al., 2018; Reyes-García and Escobar, 2021). Therefore, it is possible that CaMKII also contributes to the expression of IC-LTD and the extinction of CTA. This contribution could explain why our results show a decrease in both the magnitude of LTD and the extinction kinetics of CTA instead of a complete block of both phenomena.

In conclusion, the present results show that calcineurin inhibition slows down the CTA-extinction and blocks the maintenance of IC-LTD *in vivo*. These findings support the idea that calcineurin is a key molecular player shared by extinction and LTD.

CRediT authorship contribution statement

Salma E. Reyes-García: Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing – original draft. **Beatriz Gutiérrez-Vera:** Methodology, Investigation, Writing – original draft. **Martha L. Escobar:** Conceptualization, Methodology, Supervision, Writing – original draft, Writing – review & editing, Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This research was supported by DGAPA-PAPIIT IN-205622 and CONACYT CVU-919071. The authors thank Yectivani Juárez-Muñoz and Esteban Urrieta-Chávez for their valuable comments on this paper.

References

- Abraham, W. (2008). Metaplasticity: Tuning synapses and networks for plasticity. *Nature Reviews*, 9, 387–399. <https://doi.org/10.1038/nrn2356>

- Adaikkan, C., & Rosenblum, K. (2015). A molecular mechanism underlying gustatory memory trace for an association in the insular cortex. *ELife*, 4(OCTOBER2015), 1–15. <https://doi.org/10.7554/eLife.07582>
- Almeida-Correia, S., Moulin, T. C., Carneiro, C. F. D., Gonçalves, M. M. C., Junqueira, L. S., & Amaral, O. B. (2015). Calcineurin inhibition blocks within-, but not between-session fear extinction in mice. *Learning and Memory*, 22(3), 159–169. <https://doi.org/10.1101/lm.037770.114>
- Bermúdez-Rattoni, F. (2014). The forgotten insular cortex: Its role on recognition memory formation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 109C, 207–216. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.01.001>
- Bernstein, I. L., & Koh, M. T. (2007). Molecular signaling during taste aversion learning. *Chemical Senses*, 32, 99–103. <https://doi.org/10.1093/chemse/jj032>
- Citri, A., & Malenka, R. (2008). Synaptic Plasticity: Multiple Forms, Functions, and Mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, 1, 18–41. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301559>
- Coultrap, S. J., Freund, R. K., O'Leary, H., Sanderson, J. L., Roche, K. W., Dell'Acqua, M. L., et al. (2014). Autonomous CaMKII mediates both LTP and LTD using a mechanism for differential substrate site selection. *Cell Reports*, 6(3), 431–437. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.01.005>
- Dunning, J., & Daring, M. (2003). Molecular mechanisms of learning and memory. *Expert reviews in molecular medicine*, 25, 1–11. <https://doi.org/10.1017/S1462399403006707>
- Escobar, M. L., Alcocer, I., & Chao, V. (1998). The NMDA receptor antagonist CPP impairs conditioned taste aversion and insular cortex long term potentiation in vivo. *Brain Research*, 812, 246–251. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(98\)00931-7](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(98)00931-7)
- Escobar, M. L., & Bermúdez-Rattoni, F. (2000). Long term potentiation in the insular cortex enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Research*, 852, 208–212. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)02134-4](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)02134-4)
- Fuente, D., Federman, N., Zalman, G., & Romano, A. (2014). Calcineurin Phosphatase as a Negative Regulator of Fear Memory in Hippocampus: Control on Nuclear Factor- κ B Signaling in Consolidation and Reconsolidation. *Hippocampus*, 1561(July), 1549–1561. <https://doi.org/10.1002/hipo.22334>
- Gehrlach, D. A., Dolensek, N., Klein, A. S., Roy Chowdhury, R., Matthys, A., Junghänel, M., et al. (2019). Aversive taste processing in the posterior insular cortex. *Nature Neuroscience*, 22(9), 1424–1437. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0469-1>
- Gehrlach, D. A., Weiland, C., Gaitanos, T. N., Cho, E., Klein, A. S., Hennrich, A. A., et al. (2020). A whole-brain connectivity map of mouse insular cortex. *ELife*, 9, 1–78. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.55585>
- Groth, R. D., Dunbar, R. L., & Mermelstein, P. G. (2003). Calcineurin regulation of neuronal plasticity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 311(4), 1159–1171. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.09.002>
- Gogolla, N. (2017). The insular cortex. *Current Biology*, 27(12). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.05.010>. R580–R586.
- Hong, I., Song, B., Lee, S., Kim, J., Kim, J., & Choi, S. (2009). Extinction of cued fear memory involves a distinct form of depotentiation at cortical input synapses onto the lateral amygdala. *European Journal of Neuroscience*, 30(June), 2089–2099. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.07004.x>
- Juárez-Muñoz, Y., Ramos-Languren, L. E., & Escobar, M. L. (2017). CaMKII requirement for in vivo insular cortex LTP maintenance and CTA memory persistence. *Frontiers in Pharmacology*, 8(NOV), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00822>
- Kayyal, H., Yiannakas, A., Chandran, S. K., Khamaisy, M., Sharma, V., & Rosenblum, K. (2019). Activity of insula to basolateral amygdala projecting neurons is necessary and sufficient for taste valence representation. *Journal of Neuroscience*, 39(47), 9369–9382. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0752-19.2019>
- Kim, J., Lee, S., Park, K., Hong, I., Song, B., Son, G., et al. (2007). Amygdala depotentiation and fear extinction. *PNAS*, 104(52). <https://doi.org/10.1073/pnas.0710548105>
- Kissinger, C. R., Parge, H. E., Knighton, D. R., Lewis, C. T., Pelletier, L. A., Tempczyk, A., et al. (1995). Crystal structures of human calcineurin and the human FKBP12–FK506–calcineurin complex. *Nature*, 378, 641–644. <https://doi.org/10.1038/378641a0>
- Klavir, O., Prigge, M., Sarel, A., Paz, R., & Yizhar, O. (2017). Manipulating fear associations via optogenetic modulation of amygdala inputs to prefrontal cortex. *Nature Neuroscience*, 20(6), 836–844. <https://doi.org/10.1038/nn.4523>
- Li, W. G., Liu, M. G., Deng, S., Liu, Y. M., Shang, L., Ding, J., et al. (2016). ASIC1a regulates insular long-term depression and is required for the extinction of conditioned taste aversion. *Nature Communications*, 7, 1–15. <https://doi.org/10.1038/ncomms13770>
- Li, S. J., Wang, J., Ma, L., Lu, C., Wang, J., Wu, J. W., et al. (2016). Cooperative autoinhibition and multi-level activation mechanisms of calcineurin. *Cell Research*, 26(3), 336–349. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.14>
- Liang, J., Choi, J., & Clardy, J. (1999). Refined structure of the FKBP12–rapamycin–FRB ternary complex at 2.2 angstrom resolution. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 55, 736–744. <https://doi.org/10.1107/S0907444998014747>
- Lin, C., Yeh, S., Leu, T., Chang, W., Wang, S., & Gean, P. (2003). Identification of calcineurin as a key signal in the extinction of fear memory. *Journal of Neuroscience*, 23, 1574–1579. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-05-01574.2003>
- Lin, C.-H., Lee, C.-C., & Gean, P.-W. (2003). Involvement of a calcineurin cascade in amygdala depotentiation and quenching of fear memory. *Molecular Pharmacology*, 63, 44–52. <https://doi.org/10.1124/mol.63.1.44>
- Maffei, A., Haley, M., & Fontanini, A. (2012). Neural processing of gustatory information in insular circuits. *Current Opinion in Neurobiology*, 22, 709–716. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2012.04.001>. PMID: 22554880.
- Moguel-González, M. G., Gómez-Palacio-Schjetnan, A., & Escobar, M. L. (2008). BDNF reserves the CTA memory deficits produced by inhibition of protein synthesis. *Neurobiology of Learning Memory*, 90, 584–587. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.06.003>
- Mulkey, R. M., Endo, S., Shenolikar, S., & Malenka, R. C. (1994). Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. *Nature*, 1994(369), 486–488. <https://doi.org/10.1038/369486a0>
- Nicholls, R. E., Alarcon, J. M., Malleret, G., Carroll, R. C., Grody, M., Vronskaya, S., et al. (2008). Transgenic Mice Lacking NMDAR-Dependent LTD Exhibit Deficits in Behavioral Flexibility. *Neuron*, 58(1), 104–117. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.01.039>
- Paxinos, & Watson (2013). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. (7th Edition). Amsterdam, Boston: Elsevier.
- Reyes-García, S. E., & Escobar, M. L. (2021). Calcineurin Participation in Hebbian and Homeostatic Plasticity Associated with Extinction. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 15(June), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.685838>
- Rich, M. T., Huang, Y. H., & Torregrossa, M. (2019). Plasticity at Thalamo-amygdala Synapses Regulates Cocaine-Cue Memory Formation and Extinction Article Plasticity at Thalamo-amygdala Synapses Regulates Cocaine-Cue Memory Formation and Extinction. *Cell Reports*, 26(4), 1010–1020.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.12.105>
- Rich, X. M. T., Huang, Y. H., & Torregrossa, X. M. M. (2020). Calcineurin Promotes Neuroplastic Changes in the Amygdala Associated with Weakened Cocaine-Cue Memories. *Journal of Neuroscience*, 40(6), 1344–1354. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0453-19.2019>
- Rivera-Olvera, A., Nelson-Mora, J., Gonsebatt, M. E., & Escobar, M. L. (2018). Extinction of aversive taste memory homeostatically prevents the maintenance of in vivo insular cortex ltp: Calcineurin participation. *Neurobiology of Learning and Memory*. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.04.005>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.01.014>
- Rodríguez-Durán, L. F., Castillo, D. V., Moguel-González, M., & Escobar, M. L. (2011). Conditioned taste aversion modifies persistently the subsequent induction of neocortical long-term potentiation in vivo. *Neurobiology of Learning and Memory*, 95, 519–526. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2011.03.003>
- Rodríguez-Durán, L. F., Martínez-Moreno, A., & Escobar, M. L. (2017). Bidirectional modulation of taste aversion extinction by insular cortex LTP and LTD. *Neurobiology of Learning and Memory*, 142, 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.12.014>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.10.007>
- Rusnak, F., & Mertz, P. (2000). Calcineurin: Form and Function. *Physiological Reviews*, 80(4), 1483–1521. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.4.1483>
- Sachser, R. M., Santana, F., Crestani, A. P., Lunardi, P., Pedraza, L. K., Quillfeldt, J. A., et al. (2016). Forgetting of long-term memory requires activation of NMDA receptors, L-type voltage-dependent Ca²⁺ channels, and calcineurin. *Scientific Reports*, 6(1), 22771. <https://doi.org/10.1038/srep22771>
- Saito, Y., Matsumoto, M., Otani, S., Yanagawa, Y., Hiraide, S., Ishikawa, S., et al. (2012). Phase-dependent synaptic changes in the hippocampal CA1 field underlying extinction processes in freely moving rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 97(4), 361–369. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2012.02.006>
- Shaw, J. A., Matlovich, N., Rushlow, W., Cain, P., & Rajakumar, N. (2012). Role of calcineurin in inhibiting disadvantageous associations. *Neuroscience*, 203, 144–152. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.12.010>
- Tarasova, E. O., Gaydukov, A. E., & Balezina, O. P. (2018). Calcineurin and Its Role in Synaptic Transmission. *Biochemistry (Moscow)*, 83(6), 674–689. <https://doi.org/10.1134/s0006297918060056>
- Wang, J., Xie, R., Kou, X., Liu, Y., Qi, C., Liu, R., et al. (2019). A protein phosphatase 2A deficit in the hippocampal CA1 area impairs memory extinction. *Molecular Brain*, 12(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13041-019-0469-9>
- Williams, R. B., & Johnson, C. N. (2021). A review of calcineurin biophysics with implications for cardiac physiology. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21). <https://doi.org/10.3390/ijms222111565>
- Woolfrey, K. M., Leary, H. O., Goodell, D. J., Robertson, H. R., Horne, E. A., Coultrap, S. J., et al. (2018). *CaMKII regulates the depalmitoylation and synaptic removal of the scaffold protein AKAP79 / 150 to mediate structural long-term depression*, 293, 1551–1567. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.813808>
- Yiannakas, A., Kolatt Chandran, S., Kayyal, H., Gould, N., Khamaisy, M., & Rosenblum, K. (2021). Parvalbumin interneuron inhibition onto anterior insula neurons projecting to the basolateral amygdala drives aversive taste memory retrieval. *Current Biology*, 31(13), 2770–2784.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.04.010>
- Yiannakas, A., & Rosenblum, K. (2017). The insula and taste learning. *Frontiers in Molecular Neurosciences*, 3(10), 335–359. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00335>
- Zeng, H., Chattarji, S., Barbarosie, M., Rondi-Reig, L., Philpot, B. D., Miyakawa, T., et al. (2001). Forebrain-specific calcineurin knock-out selectively impairs bidirectional

- synaptic plasticity and working/episodic-like memory. *Cell*, 107(5), 617–629. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00585-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00585-2)
- 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. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0009-11.2011>
- Zhu, G., Briz, V., Seinfeld, J., Liu, Y., Bi, X., & Baudry, M. (2017). Calpain-1 deletion impairs mGluR- dependent LTD and fear memory extinction. *Scientific Reports*, 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep42788>