

6



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

Estudio de la participación de los receptores  
glutamatérgicos en el condicionamiento aversivo a  
los sabores y su correlación con la potenciación a  
largo plazo en la corteza insular

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIOLOGA

292394

P R E S E N T A :

Ileana Alcocer Castrejón

Directora de tesis:

Dra. Martha Lilia Escobar Rodríguez



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM

2001



FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**

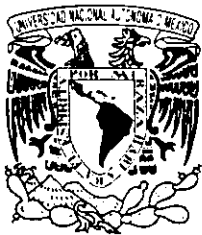


**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO**  
**Jefa de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

" Estudio de la Participación de los Receptores Glutamatérgicos en el Condicionamiento Aversivo a los Sabores y su Correlación con la Potenciación a Largo Plazo en la Corteza Insular" realizado por

Ileana Alcocer Castrejón  
 con número de cuenta 9450288-4, pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
 Propietario

Dra. Martha Lilia Escobar Rodríguez  
 Propietario

Dr. Federico Bermúdez Rattoni  
 Propietario

Dra. María de Lourdes Massie Trigo  
 Suplente  
 Q. Silvestre de Jesús Alavez Espidio

Suplente  
 Dr. Octavio Quesada García

*[Handwritten signatures and initials]*

FACULTAD DE CIENCIAS  
 U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

*[Handwritten signature]*

Dra. Luisa A. Alba Lois



DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

*Deseo dedicar esta tesis, indudablemente,  
a mis padres, que han sido apoyo e  
inspiración en todo momento.*

*Gracias mamá*

*A tu recuerdo, papá*

## **Agradecimientos**

*Siempre hay tanto que agradecer y a tanta gente que probablemente omitiré a muchas personas. Tengan por seguro que no es mi intención.*

*En primer lugar, quiero agradecer a mi directora de tesis, la Dra. Martha Escobar, quien dirigió brillantemente el presente trabajo. Ella me ha permitido conocer de cerca el trabajo de un investigador, de lo maravilloso y arduo que es hacer ciencia, así como de las grandes satisfacciones que esta actividad puede brindar. También le agradezco todo el apoyo que siempre me brindó, en todos los aspectos.*

*Un segundo agradecimiento al Dr. Federico Bermúdez que me abrió las puertas al Laboratorio de Neurobiología del Aprendizaje y la Memoria, a su conocimiento, y que funge como sinodal del presente estudio.*

*A mis sinodales Dra. Lourdes Massie, Q. Silvestre Alavez y Dr. Octavio Quesada, agradezco el tiempo que dedicaron para revisar y corregir mi tesis, haciendo valiosas aportaciones, sugerencias y comentarios para mejorarla.*

*Por supuesto, agradezco también a la gente que de una u otra manera siempre me acompañaron y apoyaron durante este tiempo, como mis compañeros de laboratorio que me sacaron de tantos problemas técnicos y conceptuales: Vincent, Lety, Ranier, Victor, Ricardo, Enrique, Maribel, Humberto, Luis.*

*A todos mis amigos, que han hecho más agradable mi vida: Laura, Luis, Carlos, Isaac, Martha, Armando, Rulo, Mac, Peter, Alfredo, Felipe, Samuel, Lety... y la lista continúa así por el estilo. Un agradecimiento en particular a Ramón, que de un tiempo a la fecha ha sido parte importante de mi diario haber.*

*A Paco y Carlos, por la simple razón de ser y estar conmigo.*

*A CICEANA y toda su gente, compañeros y amigos de trabajo.*

*Y por supuesto, a Jorge, quien me ha brindado todo.*

*A todos. MIL GRACIAS*

## Indice

I.	Introducción .....	1
II.	Antecedentes	
	II a. La neocorteza en el aprendizaje y la memoria .....	3
	II b. Lashley y la búsqueda del engrama .....	4
	II c. H.M. y el lóbulo temporal en el aprendizaje .....	6
III.	La corteza insular	
	III a. Corteza cerebral: consideraciones anatómicas y funcionales .....	9
	III b. Descripción de la corteza insular .....	13
	III c. Aferencias gustativas a la corteza insular .....	15
	III d. Paradigmas de aprendizaje involucrados en la actividad de la corteza insular .....	17
IV.	Condicionamiento Aversivo a los Sabores	
	IV a. Condicionamiento clásico .....	18
	IV b. Etología del CAS .....	19
	IV c. La amígdala y el CAS .....	21
V.	Potenciación a Largo Plazo	
	V a. Características de la LTP .....	23
	V b. LTP en la neocorteza .....	25
	V c. LTP de la conexión del núcleo basolateral amigdalino a la corteza insular .....	27
VI.	Participación de los receptores glutamatérgicos en la LTP neocortical	
	VI a. Receptores glutamatérgicos de respuesta sináptica excitadora .....	28

VI b. Participación de los receptores glutamatérgicos en la inducción de la LTP .....	36
VII. Correlatos conductuales de la LTP	
VII a. Diferentes aproximaciones para un mismo fin .....	41
VII b. Aproximaciones farmacológicas .....	44
VIII. Planteamiento del problema .....	46
IX. Procedimiento experimental	
IX a. Metodología general .....	48
IX b. Fase I .....	50
IX c. Fase II .....	52
IX d. Histología .....	55
X. Resultados	
X a. Resultados de la fase I .....	56
X b. Resultados de la fase II .....	60
XI. Discusión .....	64
XII. Referencias .....	73
Apéndice A: Inducción de la LTP en la CI .....	88
Artículo: "The NMDA receptor antagonist CPP impairs conditioned taste aversión and insular cortex long term potentiation in vivo" .....	90

## **I. Introducción**

La capacidad de reaccionar ante diversos estímulos ha sido siempre una necesidad esencial para los seres vivos de manera que una respuesta eficiente asegura la supervivencia del organismo. Los estímulos se detectan en sus diferentes modalidades por receptores sensoriales especializados a través de los cuales son traducidos y transmitidos al interior del organismo originando una respuesta mas o menos inmediata, y/o procesarse ulteriormente en estructuras progresivamente más complejas del Sistema Nervioso Central (SNC) en donde pueden almacenarse por un periodo de tiempo prolongado y ser reutilizados para facilitar una respuesta de forma más eficiente ante un estímulo posterior y similar.

Por lo tanto, el poseer un “archivo” que nos permita guardar las experiencias pasadas y obtener de éstas un tipo de información que nos asegure una mejor capacidad de respuesta, nos resulta del todo indispensable. A este “archivo” se le da el nombre de memoria y la información que le conforma es obtenida por otro proceso llamado aprendizaje.

Se puede definir de modo general al aprendizaje como el proceso mediante el cuál adquirimos información, y la memoria como el proceso que permite almacenar esa información en el tiempo (Kandel y Hawkins, 1992). Dudai (1989) sugiere además que el aprendizaje se basa en la experiencia individual, que constituye un proceso generador de cambios perdurables en el comportamiento. Lo que resulta completamente claro es que, comprender cuáles son los mecanismos que subyacen a este proceso es todavía uno de los más fascinantes retos de la neurobiología.

En el presente estudio se retoma este reto de un modo integral al relacionar los datos obtenidos al modificar una conducta de aprendizaje representada ampliamente en la escala filogenética, conocido como Condicionamiento Aversivo a los Sabores (CAS), con los resultados



obtenidos de investigaciones realizadas en la neocorteza cerebral a partir de un modelo de plasticidad sináptica extensamente documentado y que es conocido como Potenciación a Largo Plazo (LTP, por sus siglas en inglés: long-term potentiation). En la primera parte de este trabajo se desarrolla la base teórica que lo sustenta, comenzando con una revisión de la neocorteza como una estructura del SNC involucrada efectivamente en el procesamiento y almacenamiento de la memoria, destacando algunos de los trabajos más importantes en esta área de investigación. Nuestra atención se va a concentrar de modo particular en una región de la neocorteza: la corteza insular, la cual es descrita anatómicamente y funcionalmente, así como a las vías mediante las cuales se intercomunica con otras estructuras cerebrales y de cómo se le ha relacionado con determinados procesos de aprendizaje y memoria. En la actualidad se reconoce ampliamente la estrecha relación existente entre el CAS y la corteza insular por lo que se ha constituido en el modelo conductual central del presente trabajo. Teniendo en consideración los puntos anteriores, es factible establecer una relación entre el fenómeno conductual del CAS y uno de los principales modelos de plasticidad sináptica dependiente de actividad, la LTP. Se desarrollan brevemente los fundamentos de la LTP así como los mecanismos celulares implicados en su inducción, destacando la participación de los receptores glutamatérgicos. Este modelo experimental nos permite disectar con mayor detalle los procesos celulares implicados en la adquisición y el almacenaje de la información, por lo que resulta de gran interés establecer aproximaciones experimentales que logren acercar los resultados provenientes de la LTP con aquellos obtenidos a partir de paradigmas conductuales. Es en estas aproximaciones LTP-conducta, en particular de los correlatos de tipo farmacológico, en los cuáles se han sustentado los objetivos del presente estudio al correlacionar la participación de los receptores a glutamato tanto en la adquisición del CAS como en la inducción de la LTP de la conexión corteza insular-núcleo basolateral

amigdalino. Posteriormente se describe el procedimiento experimental desarrollado en la presente investigación, cuyos resultados se exponen, analizan y discuten en torno a la literatura reciente así como sus implicaciones para las neurociencias.

## **II. Antecedentes**

### ***II a. La neocorteza en el aprendizaje y la memoria***

El estudio de dónde y cómo se forma la memoria ha atraído la atención de numerosos investigadores y filósofos desde épocas remotas. En la antigua Grecia se le ubicaba a ésta y otras funciones cognitivas, además de las “propias del alma”, en la sangre, idea que persistió hasta finales de la edad media, durante la cual ya se empezaba a considerar al cerebro como poseedor de la capacidad mnemónica. Siguiendo un poco la tradición griega, en ese entonces se le situaba en el fluido ventricular (Finger, 1994).

Para principios del siglo XIX los frenólogos, iniciados por Franz Joseph Gall, comenzaban a ubicar a la memoria y otras facultades humanas (como la bondad y la inteligencia) en regiones específicas de la corteza cerebral (Fig. 1). Su importancia radica precisamente en ser el precursor de los estudios que ubican a las capacidades cognitivas del hombre en la región cortical (Young, 1990). Posterior a esta época, la ciencia (en particular la Biología) cambió sus concepciones hacia nuevos horizontes: *El Origen de las Especies* de Charles Darwin en 1859 propone la teoría evolutiva y con ello se da la pauta a numerosos estudios en anatomía y fisiología animal comparada, logrando un gran avance en la comprensión de los mecanismos básicos que permiten la vida. Las neurociencias no quedan exentas de esta influencia y desde encontramos numerosos trabajos que se han orientado hacia el estudio de la corteza cerebral y sus funciones; haremos mención particular de algunos trabajos que lograron enfatizar su relación con el aprendizaje y la memoria.

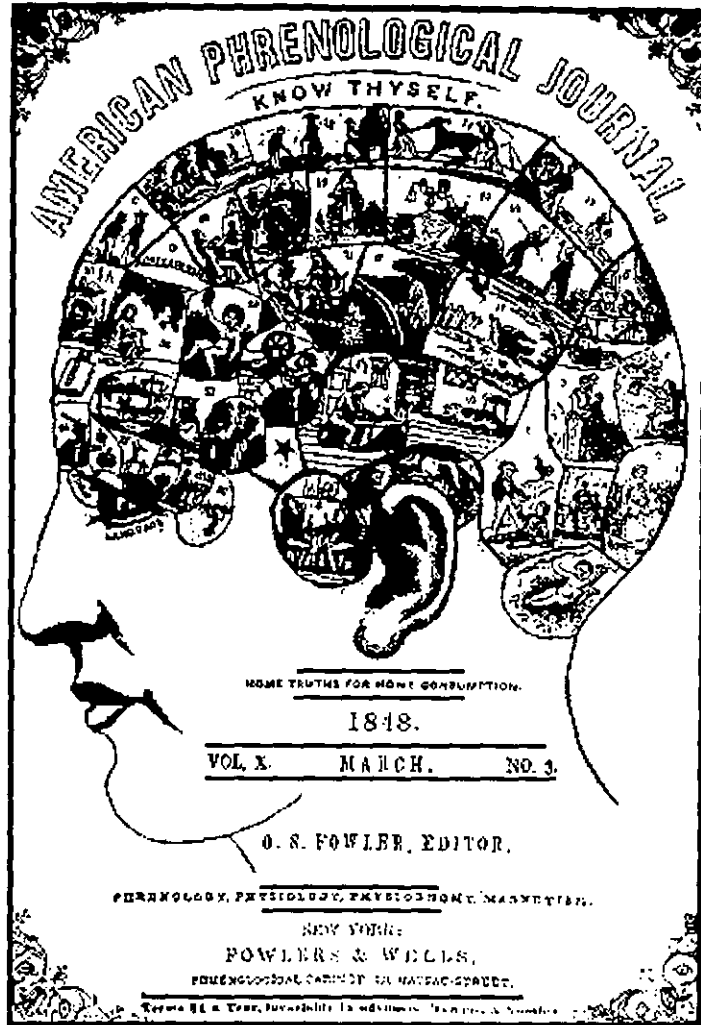


Figura 1. Mapa frenológico. La frenología heredó a las neurociencias modernas un valioso legado: la idea de la regionalización diferencial de las funciones cerebrales.

### ***II b. Lashley y la búsqueda del engrama.***

Richard Semon introdujo a principios del siglo XX el concepto de “engrama”, refiriéndose con él a los cambios en el sistema nervioso que representaban a la memoria almacenada (Squire, 1987). Ya para aquel entonces parecía claro que la memoria debía originarse en cambios

ocurridos en las neuronas (Ramón y Cajal, 1904). La cuestión ahora era conocer en qué región del cerebro se presentaban tales cambios.

Karl Lashley realizó a principios del siglo XX una serie de experimentos encaminados a la búsqueda del engrama. Para esto, Lashley efectuó lesiones incrementando gradualmente su área de lesión en la corteza cerebral de ratas. Así observó que al aumentar el tamaño de la lesión, aumentaba la dificultad para adquirir una tarea de aprendizaje, y de forma proporcional, disminuía la capacidad de los animales de recordar la misma. La tarea empleada por Lashley consistía en aprender a resolver un laberinto, evitando entrar en los "callejones sin salida" en las pruebas consecutivas. Así, conforme el animal aprendía la ruta correcta, recordaba que camino seguir y reducía el tiempo que tardaba en recorrerlo en cada ensayo. Basándose en sus resultados, Lashley consideró que la memoria no se ubicaba en algún punto localizado de la corteza cerebral sino que se distribuía de modo homogéneo en ésta. Tales conclusiones fueron severamente cuestionadas por no haber tomado en consideración la posibilidad de que la rata pudiera resolver el laberinto empleando diversas claves (espaciales o sensoriales). Otro problema que presentaba el modelo de Lashley fue lo burdo que podían resultar las lesiones efectuadas, lo que finalmente restaba especificidad al ensayo al dañar estructuras cerebrales no corticales (Fig. 2).

Pése a esto, Lashley figura como uno de los principales precursores de los estudios experimentales de las funciones mnémicas en la corteza, así como en el empleo de paradigmas de aprendizaje en animales para el estudio fisiológico del aprendizaje y la memoria (Squire, 1987). Actualmente se conoce que, si bien no toda la corteza participa en el procesamiento de la memoria, ésta sí se distribuye en diferentes áreas de la misma.

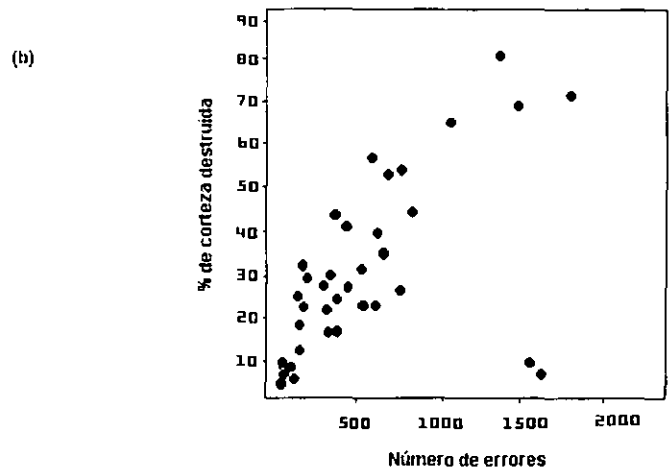
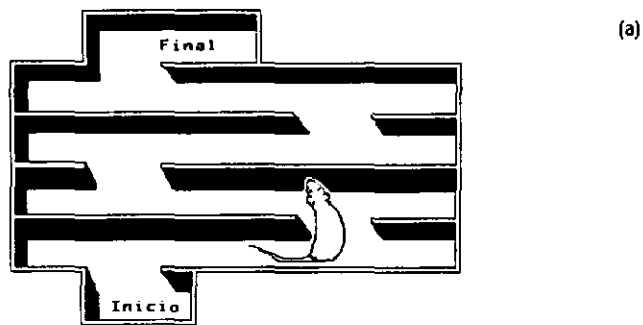


Figura 2. Esquema del laberinto usado por Lashley en sus experimentos: (a) la rata debía aprender a recorrer el laberinto evitando entrar a los “callejones sin salida”. (b) En la gráfica se observa una correspondencia directa entre el área cortical dañada y el número de errores registrados.

**II c. H.M. y el lóbulo temporal en el aprendizaje**

Posteriormente el estudio de casos clínicos de personas con lesiones cerebrales resultaron de gran utilidad en la comprensión de las regiones corticales involucradas en el aprendizaje y la memoria. Uno de los casos más trascendentes fue el que se refiere a un paciente conocido por sus iniciales como H.M. (Scoville y Milner, 1957), quien padecía severas crisis epilépticas, por lo que fue sometido a una cirugía bilateral consistente en la disección de una extensa zona del lóbulo temporal medial y regiones involucradas (formación hipocampal, complejo amigdalino y áreas

corticales adyacentes) (Fig. 3). La remoción de estas estructuras tuvo para H.M. graves consecuencias, pues si bien mejoró sustancialmente el problema de sus crisis epilépticas, presentó una severa amnesia anterógrada; esto significó la pérdida de sus recuerdos desde momentos antes de su operación y todos los posteriores a la misma. H.M. es incapaz de formar nuevos recuerdos, sin embargo conserva claramente los recuerdos anteriores a la cirugía (su infancia, su familia, su barrio, etc.).

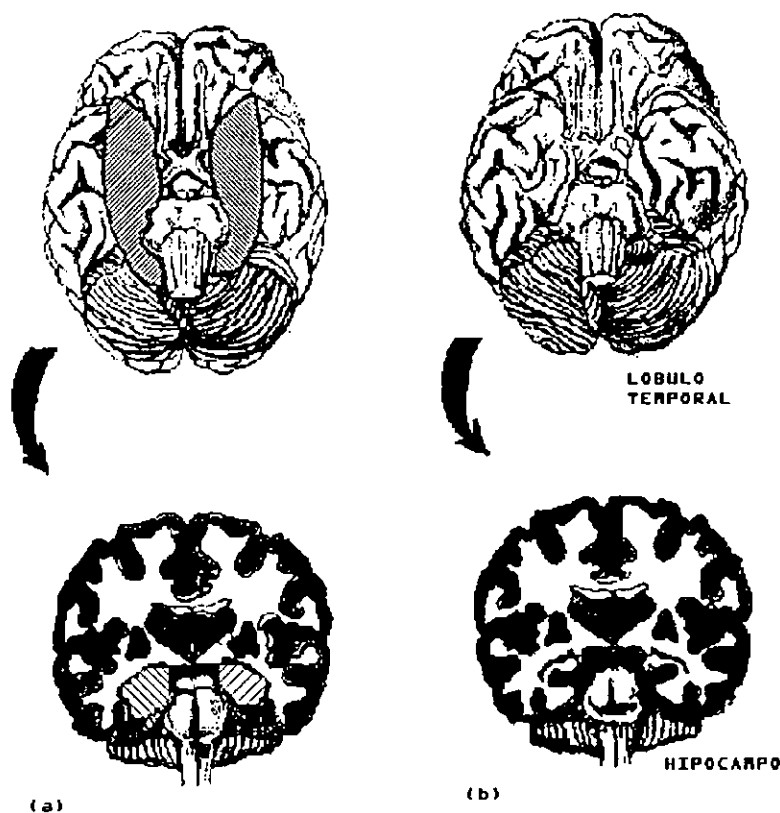


Figura 3. Esquema de la lesión practicada al cerebro de H.M (a) en comparación con un cerebro normal (b). La zona achurada representa el área lesionada. El panel superior representa la vista basal del cerebro de H.M. antes (derecha) y después (izquierda) de la operación. En el panel inferior se esquematiza un corte coronal de la misma lesión.

Algo que resulta de interés es que, mediante la práctica, H.M. es capaz de aprender actividades de tipo “mecánico” (como dibujar una

imagen viendo su reflejo en un espejo), y conserva su memoria inmediata. Con H.M. y otros casos similares (aunque menos severos), se inició una serie de investigaciones en las que se hizo evidente que existen distintos tipos de memoria (declarativa y de trabajo, a corto y largo plazo, etc.), que la capacidad de formar nuevos recuerdos era una función cerebral distinta a otros procesos cognitivos, que la memoria es dependiente de ciertas vías anatómicas y que realmente consistía en un proceso subordinado a eventos específicos para su consolidación en recuerdos perdurables (Kandel y Hawkins, 1992).

Cuáles eran los mecanismos por los que se adquiría, formaba y consolidaba la memoria eran las principales interrogantes a resolver y la investigación básica que continuó a los datos clínicos provistos por el caso H.M. y similares estableció nuevos modelos y pruebas, entre los que destacan los realizados por Mishkin y Appenzeller(1987) y Squire y Zola-Morgan (1991) en primates no humanos y en los que se resalta la función de la región media del lóbulo temporal (corteza entorrinal, amígdala e hipocampo) como un sistema que permite el establecimiento de la memoria declarativa a largo plazo para su posterior almacenaje en la neocorteza.

Paralelo a los estudios mencionados se han realizado extensas investigaciones que confirman la importancia de las áreas neocorticales en el mantenimiento de los recuerdos. Los avances tecnológicos han permitido realizar trabajos tan finos como puede ser medir la actividad eléctrica de grupos reducidos de neuronas mientras se evoca un recuerdo al presentar algún estímulo al que se le haya asociado, como un sonido a una descarga eléctrica (Quirk y col, 1997) o un olor a una recompensa (Schoenbaum y Eichenbaum, 1995). Con relación a los correlatos neuronales de la memoria Eichenbaum postula que la memoria se refleja en la capacidad de las células corticales para modular sus respuestas evocadas por un estímulo, ya sea incrementando o disminuyendo su respuesta ante él, y en su capacidad para mantener o reactivar una

respuesta en ausencia del estímulo que se requería normalmente para evocarlo (Eichenbaum,1997).

En consideración a lo anterior nos encontramos ante un problema complejo, en el que para comprender cómo aprendemos y cómo recordamos resulta evidente que las aproximaciones que debemos realizar al abordar estos problemas no pueden restringirse exclusivamente a pruebas conductuales, estructuras anatómicas o procesos celulares de modo aislado, sino integrarlos en modelos que nos ofrezcan una visión global del proceso.

### **III.- La Corteza Insular**

#### ***III a. Corteza Cerebral: consideraciones anatómicas y funcionales.***

Si observamos el SNC de los diferentes grupos de vertebrados será posible observar que la parte más prominente es la región cefálica. Durante el tiempo de gestación de un embrión es notoria la proporción que ocupa el cerebro en comparación con el resto del cuerpo (casi una tercera parte del total). En particular, la corteza cerebral se desarrollará a partir del telencéfalo.

La neocorteza cerebral comprende la región más superficial de los hemisferios cerebrales. Han sido numerosos los estudios anatómicos en torno a ella, entre los que destacan aquéllos efectuados a principios de siglo por Santiago Ramón y Cajal (1904), quien realizó una excelente descripción de los diferentes tipos celulares que la componen y cómo se organizan en diversas capas. Aunque él describió originalmente siete, actualmente se acepta la existencia de seis. La capa más superficial es denominada capa molecular o número 1, rica en fibras y con muy pocas neuronas. La capa 2 o granular externa contiene neuronas pequeñas agrupadas densamente, y de modo similar se conforma la capa 4 o granular interna. La capa 3 o capa piramidal externa puede ser reconocida



por su contenido de células piramidales de tamaño mediano, mientras que en la capa 5 o piramidal interna las células piramidales que la conforman son de gran tamaño. La capa 6 o capa multiforme contiene un elevado número de células de cuerpo ahusado (Brodal, 1992)(Fig. 4).

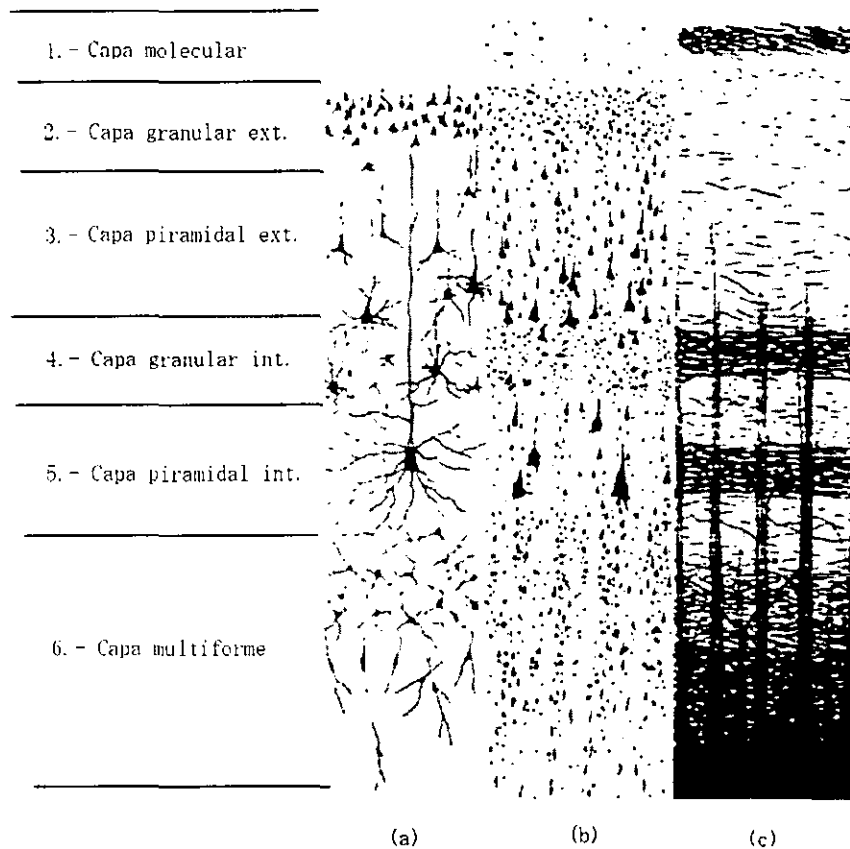


Figura 4. Estructura básica en capas de la neocorteza vista mediante tres técnicas de tinción: (a) Golgi, (b) tinción de treonina y (c) tinción de mielina (Modificado de brodal, 1992)

De manera empírica suele distinguirse a la corteza en dos porciones muy bien definidas, la materia gris y la materia blanca. La primera toma su nombre del color característico originado por la presencia predominante de cuerpos neuronales, mientras la materia blanca está constituida principalmente de fibras axonales mielinizadas, que le confieren su color claro. Estos cuerpos neuronales y sus prolongaciones, establecen

intrincadas conexiones capaces de establecer circuitos precisos y finamente regulados.

En el desarrollo filogenético de las especies de vertebrados, la corteza cerebral ha experimentado modificaciones sustanciales, lo que ha permitido su división en tres tipos corticales principales a saber: la allocorteza (la más primitiva y que comprende la mayor proporción de la corteza olfativa), la paleocorteza (constituída por la formación hipocampal) y la más reciente denominada neocorteza, que comprende el grueso de la superficie cortical en mamíferos.

En la complejidad que presenta la disposición de las células corticales, Rakic (1991) resalta cuatro consideraciones de importancia a saber; a) la expansión neocortical durante la filogenia (Fig. 5); b) la expansión diferencial de las áreas citoarquitectónicas de la misma; c) la introducción durante la evolución de nuevas áreas citoarquitectónicas y d) aún en una misma especie se observan variaciones en el tamaño de un área cortical.

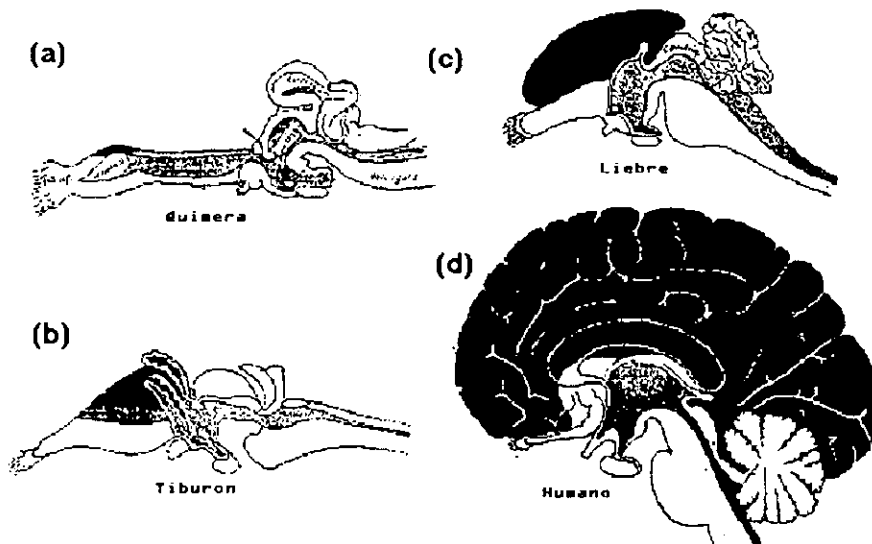


Figura 5. Desarrollo de la neocorteza en la escala filogenética. En negro se señala el neopallium de (a y b) dos peces y (c y d) dos mamíferos (liebre y humano, respectivamente).

En 1909, Korbinian Brodman regionaliza al cerebro en 50 áreas discretas con base a sus diferencias citoarquitectónicas (Fig. 6). Para este fin empleó parámetros como las densidades de los cuerpos celulares y de los axones mielinizados. Brodman destacó que si bien, las capas celulares eran prácticamente las mismas, el grosor y densidades celulares variaban en las diferentes regiones de la corteza. Con el paso del tiempo numerosos investigadores han establecido ciertas correlaciones entre las áreas de Brodman y las distintas funciones relacionadas con la misma (Kandel y col, 1991).

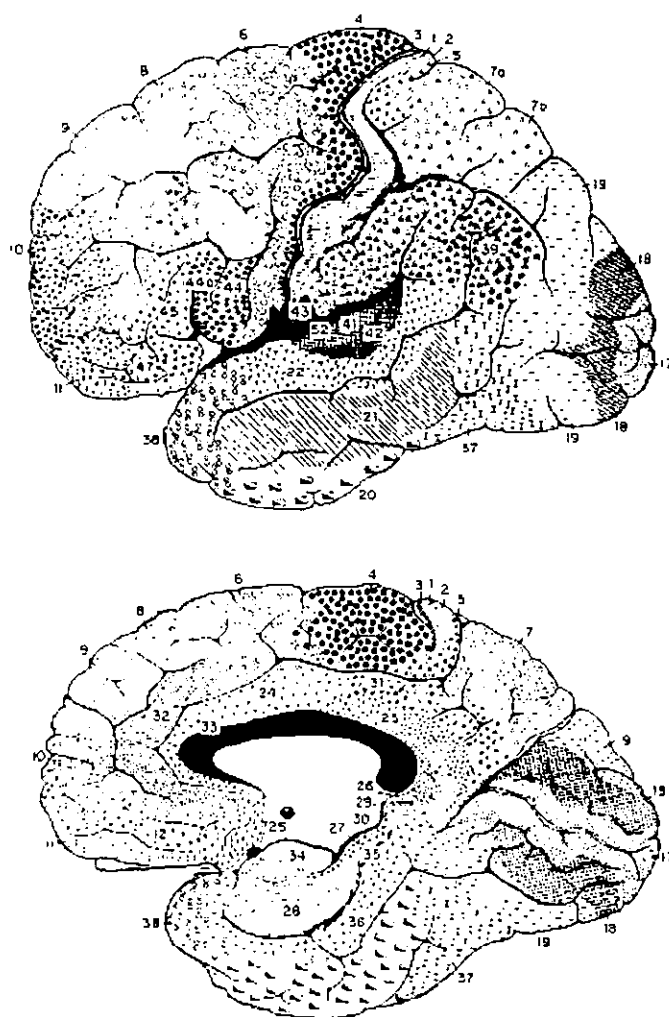


Figura 6. Mapa citoarquitectónico del cerebro humano, según Brodmann.

En la superficie cortical se distribuyen áreas que por conveniencia se han clasificado en tres tipos de acuerdo a su función, ya sea motora, sensorial o de asociación. Las dos primeras, cuando son primarias, reciben o envían información de tipo motor o sensorial que se puede enviar posteriormente a regiones secundarias o terciarias, denominadas de alto orden y que suelen procesar aspectos más complejos de una misma modalidad sensorial o información de tipo motor. Las áreas de asociación en cambio, no reciben información directa del estímulo que lo originó, sino que la reciben ya procesada de aquellas zonas de alto orden. Esto capacita al organismo para establecer relaciones entre los diversos estímulos que recibe, lo que incrementa de manera considerable las posibilidades de respuesta ante determinadas situaciones. En primates, incluido el hombre, las áreas asociativas son extensas (Kandel y col, 1991).

Los hemisferios cerebrales se constituyen no solo por la corteza cerebral, sino por otras estructuras entre las que destacan los ganglios basales, el hipocampo y los núcleos amigdalinos cuya importancia se resaltarán posteriormente para comprender su función en los procesos de aprendizaje y memoria.

Ahora bien, si el establecer en la corteza diferentes regiones anatómicas y funcionales no ha sido labor sencilla, asignarle a una o a varias de estas regiones una función en particular, ha resultado todavía más difícil.

### ***III b. Descripción de la Corteza Insular***

La Corteza Insular (CI), área neocortical ubicada en las regiones 13 y 14 de Krieg en el lóbulo temporal, ha resultado de gran interés no solo por su participación en el procesamiento de estímulos gustativos (Braun y col, 1982; Lasiter y col, 1982; Kiefer, 1985), sino porque diversos estudios han demostrado su participación en diversas tareas de aprendizaje, principalmente aquellas relacionadas con situaciones motivadas

aversivamente (Dunn y Everitt, 1988; Escobar y col, 1989; Bermúdez-Rattoni y Mc.Gaugh, 1991). A partir de sus características citoarquitectónicas se pueden distinguir tres zonas en su estructura: agranular, disgranular y granular, dependiendo de la mayor o menor presencia de neuronas granulares (Capa cortical IV). La corteza insular en ratas comprende un área de aproximadamente 3mm x 1mm que corre por encima y a lo largo del surco rhinal, alrededor de la arteria cerebral media (Braun y col, 1982), se extiende dorsalmente hacia los bordes de las áreas somatosensoriales primaria y secundaria (Fig. 7); posee una región anterior que es principalmente agranular y una región posterior con dos subregiones denominadas disgranular y granular. La CI agranular se fusiona imperceptiblemente con la corteza perirhinal (Paxinos, 1995). Estudios electrofisiológicos mediante estimulación y evocación de señales de la lengua a la corteza gustativa, sugieren que en ratas los estímulos gustativos están confinados a la región agranular, aunque en primates se ha observado mayor correspondencia en la región granular y disgranular (Travers, 1993).

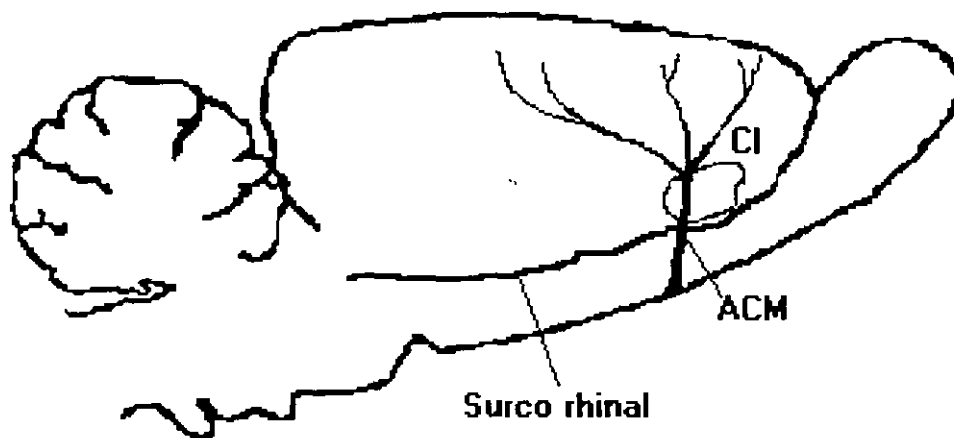


Figura 7. Esquema que muestra la ubicación de la corteza insular en el cerebro de rata. CI = corteza insular, ACM = arteria cerebral media.

### **III c. Aferencias gustativas a la corteza insular**

En la actualidad se cuenta con información bastante precisa que nos describe cuál es el recorrido anatómico que siguen los estímulos gustativos de la periferia hacia la neocorteza, basándose en estudios anatómicos, electrofisiológicos y conductuales. Todo comienza cuando un sabor es detectado por los receptores gustativos de la boca y transmitido hacia la porción anterior del núcleo del tracto solitario (NTS) en el tallo cerebral, vía los nervios craneales facial (VII) y glosofaríngeo (IX) principalmente y de manera secundaria por el vago (X). El segundo relevo del estímulo gustativo se ubica en el núcleo parabraquial del puente, en lo que se ha denominado área gustativa del puente (Pontine Taste Area, en inglés; PTA). Una vez aquí, se reconocen dos rutas a seguir: en su mayoría, las aferencias del PTA se dirigen a estructuras ventrales del cerebro basal, como son la amígdala, la zona lateral del hipotálamo y la sustancia innominata; la segunda ruta se dirige al complejo ventrobasal del tálamo, el cual se comunica con la corteza insular (Travers, 1993) (Fig. 8). Lasiter y colaboradores (1982) describen mediante el empleo de peroxidasa de rábano la existencia de proyecciones directas entre el PTA y la neocorteza, a las que les adjudican una función de discriminación fina de sabores.

Para tener un marco de referencia más amplio respecto al tipo de información que procesa la CI resulta importante destacar que nuestro primer relevo en este circuito (el NTS) recibe también señales muy importantes provenientes de la rama hepática del vago así como señales del área postrema y del sistema vestibular. Estas señales proveen información relacionada con irritación por intoxicación estomacal, intoxicación sanguínea y sensación de náusea, respectivamente, las cuales llegan a la CI, por lo cual se le ha denominado corteza visceral. Además, se debe considerar la conectividad recíproca y funcional de la CI con la amígdala, estructura cerebral vinculada estrechamente con la memoria aversiva (LeDoux, 1993, McGaugh y col, 1990), en particular con las proyecciones que recibe directamente del núcleo basolateral amigdalino

(Krettek y Price, 1974; Escobar y col, 1989; Bermúdez-Rattoni y McGaugh, 1991). A partir de esto ha sido posible considerar a la CI como una estructura fundamental en los procesos de integración y almacenaje de información gustativo-visceral, capaz de dirigir conductas motivadas por este tipo de información, como la evitación o aceptación de un alimento dependiente de una experiencia gustativa previa (Kiefer, 1985; Bermúdez-Rattoni y McGaugh, 1991).

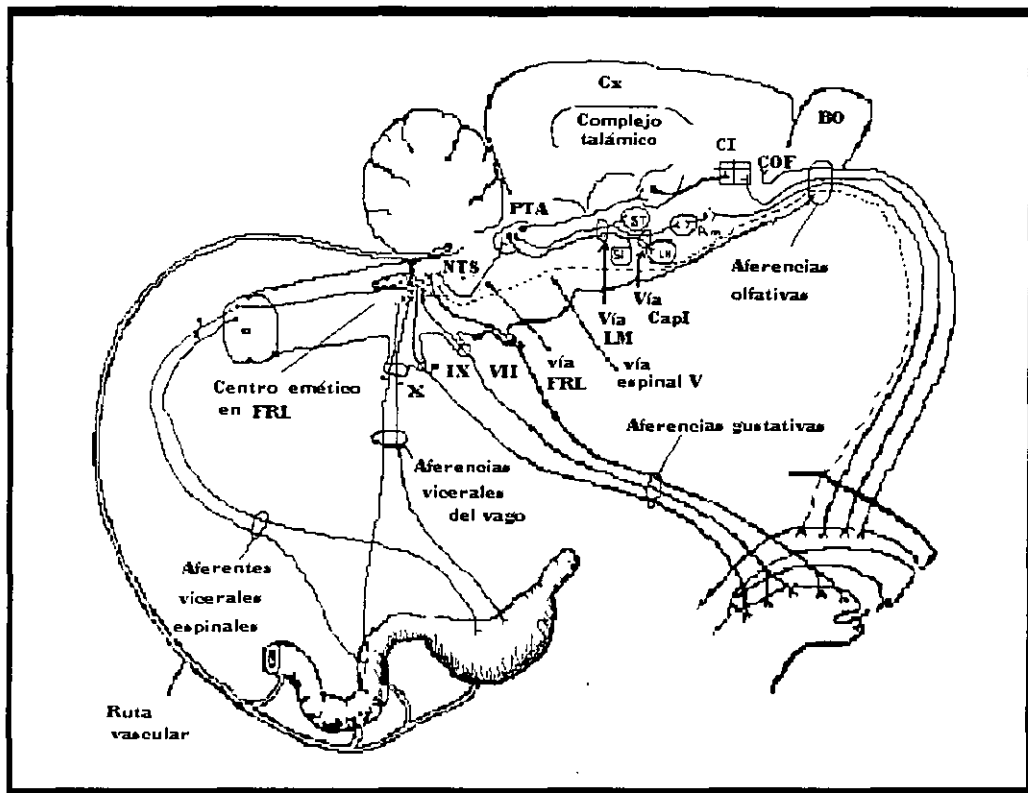


Figura 8. Vías involucradas en las aferencias gustativas a la corteza insular: PTA=área gustativa del puente, Am=amígdala, BO=bulbo olfatorio, CapI= cápsula interba, CI=corteza insular, COF=neocorteza orbitofrontal, Cx=corteza, FRL=formación reticular lateral, HL= hipotálamo lateral, LM=lemnisco medial, NTS= núcleo del tracto solitario, SI=sustancia innominata, ST= núcleo subtalámico, TC =tallo cerebral,

### **III d. Paradigmas de aprendizaje involucrados en la actividad de la corteza insular**

Debido a su función integradora de estímulos gustativos y viscerales, los primeros estudios referentes a la memoria en la CI se estudiaban con el Condicionamiento Aversivo a los Sabores (CAS). De forma natural, cualquier animal evita volver a ingerir un alimento que le haya provocado algún malestar gástrico con anterioridad, el individuo asocia el sabor de ese alimento con su malestar y aprende a no ingerir nuevamente nada que posea ese mismo sabor. En el CAS se asocia una irritación gástrica provocada, por ejemplo, por cloruro de litio (LiCl) a un sabor determinado, de manera que cuando el animal prueba nuevamente aquel sabor, presentará una respuesta de rechazo al asociarlo con el malestar (en el siguiente capítulo se describirá con mayor detalle este paradigma). La CI ha sido implicada en la adquisición y almacenamiento de diferentes tareas de aprendizaje tales como el CAS, laberintos espaciales y la prevención pasiva (Escobar y col, 1989; Bermúdez-Rattoni y McGaugh, 1991, Bermúdez-Rattoni y col, 1995).

Los substratos anatómicos utilizados en el aprendizaje del CAS han sido bien establecidos (Kiefer, 1985; Braun 1982). En este sentido se ha demostrado que las lesiones bilaterales de la CI afectan la adquisición y retención del CAS (Brown y col, 1982; Yamamoto y col, 1980). Debido a que las lesiones de la CI no producen deficiencias en la sensibilidad gustativa o gastrointestinal, se ha sugerido que las lesiones de la CI afectan la representación mnémica de los sabores y sus consecuencias gastrointestinales (Kiefer, 1985).

En estudios similares se ha observado que al combinar lesiones bilaterales de la CI con lesiones en la amígdala la respuesta del CAS se agudiza (Yamamoto, 1995), lo que resalta la estrecha conectividad entre la CI y la amígdala para la adquisición y el recuerdo de esta tarea.

Lesiones con N-metil-D-aspartato (NMDA) en la región caudal de la CI afectan el aprendizaje en el laberinto de agua de Morris, mientras que si



las lesiones se realizan en la región central se afectan tanto el laberinto de agua como el CAS, lo que sugiere que la CI presenta una funcionalidad heterogénea (Nerad-L y col, 1996). Recientemente se ha observado que las lesiones en CI también dañan la adquisición del condicionamiento inmunosupresor (Ramírez-Amaya y col, 1998).

#### **IV.- Condicionamiento Aversivo a los Sabores**

Desde hace más de un siglo se conoce la existencia del condicionamiento aversivo a los sabores (CAS), sin embargo es hasta 1955 cuando John García formaliza este paradigma de aprendizaje en el contexto de la neurobiología, lo cual convierte a García en el precursor de una línea de investigación que ha superado sus expectativas iniciales, mostrándonos nuevos aspectos de los procesos del aprendizaje y la memoria (Bures, 1998).

##### ***IV a. Condicionamiento Clásico (CC)***

Existen estímulos de muy diversa índole, muchos de los cuales evocan una cierta respuesta conductual; a este tipo de estímulo se les conoce como estímulo incondicionado (EI) y a la respuesta que provoca, respuesta incondicionada (RI). Cuando un estímulo es neutro o casi neutro con respecto a una RI, y se presenta asociado al EI, es capaz de producir una respuesta similar a la RI, denominada respuesta condicionada (RC) y al estímulo que la produce estímulo condicionado (EC) (Dudai, 1989). Este proceso se conoce como condicionamiento clásico y representa uno de los ejemplos más comunes de aprendizaje asociativo. Por lo general, es necesario realizar varias repeticiones entre la asociación del EC y el EI para lograr que el primero sea capaz de producir la RC que se espera. También se ha observado que es necesaria la presentación de ambos estímulos al mismo tiempo o con un intervalo muy breve entre los dos (anteponiendo siempre el EC al EI). En el condicionamiento clásico de

las lesiones se realizan en la región central se afectan tanto el laberinto de agua como el CAS, lo que sugiere que la CI presenta una funcionalidad heterogénea (Nerad-L y col, 1996). Recientemente se ha observado que las lesiones en CI también dañan la adquisición del condicionamiento inmunosupresor (Ramírez-Amaya y col, 1998).

#### **IV.- Condicionamiento Aversivo a los Sabores**

Desde hace más de un siglo se conoce la existencia del condicionamiento aversivo a los sabores (CAS), sin embargo es hasta 1955 cuando John García formaliza este paradigma de aprendizaje en el contexto de la neurobiología, lo cual convierte a García en el precursor de una línea de investigación que ha superado sus expectativas iniciales, mostrándonos nuevos aspectos de los procesos del aprendizaje y la memoria (Bures, 1998).

##### ***IV a. Condicionamiento Clásico (CC)***

Existen estímulos de muy diversa índole, muchos de los cuales evocan una cierta respuesta conductual; a este tipo de estímulo se les conoce como estímulo incondicionado (EI) y a la respuesta que provoca, respuesta incondicionada (RI). Cuando un estímulo es neutro o casi neutro con respecto a una RI, y se presenta asociado al EI, es capaz de producir una respuesta similar a la RI, denominada respuesta condicionada (RC) y al estímulo que la produce estímulo condicionado (EC) (Dudai, 1989). Este proceso se conoce como condicionamiento clásico y representa uno de los ejemplos más comunes de aprendizaje asociativo. Por lo general, es necesario realizar varias repeticiones entre la asociación del EC y el EI para lograr que el primero sea capaz de producir la RC que se espera. También se ha observado que es necesaria la presentación de ambos estímulos al mismo tiempo o con un intervalo muy breve entre los dos (anteponiendo siempre el EC al EI). En el condicionamiento clásico de

*Aplysia*, que ha sentado las bases para el estudio biológico del aprendizaje, se ha calculado un intervalo máximo de 0.5 segundos entre el EC y el EI (Kandel y Hawkins, 1992).

#### **IV b. Etología del CAS.**

Todos los seres vivos tienen la necesidad de obtener las sustancias que les aseguren un aporte adecuado de energía para la realización de sus actividades diarias. Estas sustancias son obtenidas mediante la ingestión de comida y las subsecuentes transformaciones metabólicas que implica para el organismo la presencia de cada alimento en su cuerpo. Para que el organismo sea capaz de obtener los nutrientes que requiere es necesario que desarrolle conductas que le faciliten la captación de los mismos; estas conductas incluyen el reconocimiento de las necesidades corporales ante un bajo nivel de energía o la necesidad de una sustancia en particular (sensación de hambre), identificar si las sustancias que come son capaces de cubrir sus necesidades energéticas con el fin de encontrar y consumir las cantidades adecuadas de tales alimentos y por último, regular los procesos que logren que la ingesta de alimentos se realice siempre que se necesite. Por lo anterior, resulta claro percatarse de la importancia evolutiva que ha tenido el desarrollar mecanismos neuronales sumamente especializados capaces de controlar de modo eficiente la ingesta de los alimentos y las consecuencias que éstos tengan para cada organismo (Bures y col, 1998).

Es indispensable que cada ser vivo aprenda y recuerde qué lo nutre y qué lo enferma. Lo que hasta la fecha se conoce con respecto a este punto es la estrecha asociación entre los estímulos viscerales y los estímulos externos, es de esperarse que si un estímulo externo es asociado a una sensación de malestar físico la respuesta adecuada sea evitar ese estímulo. En uno de sus primeros trabajos, García y Koelling (1966) observaron que, al parecer, sólo el apareamiento entre sensaciones gustativas (e inclusive olfativas) con agentes causantes de irritación

gástrica y náusea eran capaces de establecer y reforzar una conducta aversiva hacia determinados sabores, mientras que en asociaciones con estímulos audiovisuales la conducta no se mantenía; ésto permitió pensar que la sensación de náusea es importante para establecer el CAS por mayor tiempo. Actualmente se reconocen dos vías importantes para la formación de las sensaciones de malestar o émesis: cuando el estímulo que la origina proviene de una irritación gástrica, la señal se conduce por el nervio vago hacia el NTS y de aquí se proyecta finalmente al centro emético, situado en la formación reticular. La otra vía se establece con la presencia de toxinas en la sangre, que al ser detectadas por la región quimiosensitiva del área postrema, inicia el reflejo emético. En ratas vagotomizadas se ha observado que la aversión es débil cuando se induce por irritación gástrica y que ésta se extingue rápidamente, resaltando así la importancia que tiene la asociación entre los síntomas de malestar físico (náusea, dolor, vómito, diarrea) y el sabor de las sustancias ingeridas para la adquisición y mantenimiento del CAS (Kiefer, 1985).

Al hablar de la CI se destacó su importante función para la formación del CAS y las vías anatómicas que median entre ella y la recepción de los estímulos gustativos y viscerales. La manera en que se han estructurado dichas conexiones le han proferido al CAS características que lo convierten en un valioso paradigma de aprendizaje, como son el conocimiento que se tiene de las principales estructuras involucradas en la transferencia y asociación de los estímulos que inducen un CAS y lo relativamente fácil que es obtener un efecto conductual (Kiefer, 1985).

Entre las similitudes que presenta el CAS con respecto al condicionamiento clásico es posible mencionar su tendencia a generalizar (la aversión a un sabor se extiende a otros alimentos o sustancias con sabores muy similares), presenta un periodo de extinción, es decir, un debilitamiento de la respuesta condicionada ya establecida (con la particularidad de que en el CAS tal extinción suele ser resistente), y que el condicionamiento es muy fuerte cuando el estímulo condicionado es

novedoso. Cuando por experiencias previas el organismo reconoce a un estímulo condicionado como seguro, el desarrollo de la respuesta condicionada ante este estímulo se ve retardada y este fenómeno es conocido como inhibición latente. Algunas de las características más importantes del CAS son su selectividad hacia los estímulos gustativos, el que un solo entrenamiento basta para obtener una fuerte respuesta aversiva ante un sabor novedoso, y algo muy peculiar es el que sea posible la asociación entre el estímulo condicionado y el estímulo incondicionado cuando entre ambos median tiempos bastante amplios, desde minutos hasta horas (Bernstein, 1991).

Es sobresaliente esta peculiaridad del CAS con respecto a la temporalidad entre la presentación del EC y el EI. Bures postula la formación de una memoria gustativa a corto plazo al ser presentado el EC. La memoria gustativa a corto plazo requiere de la participación de la neocorteza donde puede asociarse finalmente al EI y formar la memoria gustativa a largo plazo. Cuando se decortican ratas antes de la presentación del sabor no se logra la asociación con el malestar intestinal producido por el LiCl y por lo tanto no se observa el CAS. Cuando esta decortización se realiza después de la presentación del sabor, sí hay asociación con el EI y es posible el CAS. Se considera que la formación de la memoria gustativa a corto plazo es lenta, alcanza su máximo entre los primeros 10 a 60 minutos después de la percepción del EC y decae hasta cero entre las 8 y 12 horas. Este mecanismo puede corresponder al tiempo que tarda el sistema digestivo en transportar y detectar los efectos de las sustancias tóxicas que se hubiesen ingerido (Bures, 1998).

#### ***IV c. La amígdala y el CAS***

La amígdala es una estructura constituida por un agregado neuronal de forma almendrada localizada en la región ventral del lóbulo temporal, entre la cápsula interna y el hipotálamo. La amígdala posee una estructura celular compleja donde ha sido posible distinguir de modo

general, dos masas nucleares: el grupo nuclear corticomedia, filogenéticamente antiguo, conformado por los núcleos medial, central y cortical, y el grupo nuclear corticobasal, región filogenéticamente reciente, constituida por los núcleos basales y temporales (Bermúdez-Rattoni y Yamamoto, 1998).

La amígdala ha sido relacionada frecuentemente con las funciones emotivas, más que con las cognitivas (LeDoux, 1993). Se ha observado que la estimulación de diferentes áreas de la amígdala se vincula a cambios en el sistema nervioso autónomo, en particular a cambios asociados con la expresión de miedo y ansiedad (Davis, 1994). Reacciones como el incremento en la presión sanguínea, dilatación de la pupila y salivación son mediadas por las proyecciones del núcleo central de la amígdala. Se ha considerado a la amígdala como un enlace entre estímulos y recompensas (Gaffan, 1992), como la base neuroanatómica de los cambios neurales que subyacen a la memoria afectiva (Davis, 1992) o bien, como una estructura capaz de regular el almacenaje de información en otras regiones cerebrales siempre que sea activada por un estímulo emocional; esto es, que la amígdala es capaz de fortalecer las memorias al relacionarlas con su significado emocional (McGaugh, 1990).

Las lesiones en la amígdala han sido asociadas con efectos adversos en la realización de pruebas de aprendizaje como la prevención pasiva (Liang y col, 1990; McGaugh y col, 1995), la potenciación al reflejo del miedo (Falls y col, 1992) y la prevención activa (Bermúdez-Rattoni y col, 1997).

La evidencia experimental ha logrado establecer un estrecho vínculo entre la amígdala y su participación en el CAS. Richardson (1973) observó que la estimulación de los núcleos basolateral o corticomedia de la amígdala produce inhibición en el consumo de alimentos. Lasiter demostró la presencia de proyecciones amígdalocorticales entre la neocorteza gustativa y los núcleos lateral y basolateral de la amígdala. En la actualidad es bien conocido que la CI recibe proyecciones directas

provenientes del núcleo basolateral amigdalino (Bla) y que ambas estructuras contribuyen decisivamente a la formación y retención de la memoria asociada a sabores (Bermúdez-Rattoni y col, 1997; Bermúdez-Rattoni y McGaugh, 1991). Así mismo, se ha observado que el lesionar el Bla altera la respuesta de la aversión al sabor, mientras que las lesiones en el núcleo central de la amígdala no producen un efecto similar (Yamamoto y col, 1995; Morris y col, 1999). Esto sugiere una participación decisiva del Bla en el CAS, lo cual se sustenta aún más si consideramos la interconectividad recíproca y funcional existente entre éste núcleo y la CI (Escobar y col, 1989).

## **V. Potenciación a Largo Plazo**

Al citar anteriormente a Eichenbaum se mencionó que la memoria se reflejaba en la capacidad de las neuronas para modular las respuestas evocadas por un estímulo y para reactivar una respuesta en ausencia del estímulo que la originó (Eichenbaum, 1997). En concordancia con lo anterior es posible considerar ciertos eventos de neuromodulación (entendida como la habilidad que presentan las neuronas para alterar sus propiedades eléctricas en respuesta a cambios bioquímicos intracelulares) resultantes de estimulación sináptica u hormonal, como la base de procesos de plasticidad en el sistema nervioso, tales como el aprendizaje y la memoria (Kaczmarek and Levitan, 1987). Uno de los modelos de plasticidad sináptica más aceptados en la actualidad para comprender los mecanismos que subyacen a la formación y mantenimiento de la memoria es la LTP.

### ***V a. Características de la LTP***

Para entender los procesos de aprendizaje y memoria es necesario recordar que el cerebro se estructura por redes neuronales, cuyas neuronas se comunican mediante sinapsis. La sinapsis es considerada

debido a sus características, como el lugar en el que se efectúan las modificaciones que conducen al almacenamiento de información en aquellas neuronas involucradas en ciertos tipos de aprendizaje. Donald Hebb (1949) postuló que, “cuando el axón de una célula A esta lo suficientemente cerca para excitar a una célula B y repetida o persistentemente toma parte en su activación, algún tipo de proceso de crecimiento o cambio metabólico tiene lugar en alguna de las dos células, de modo que la eficiencia de A para activar a B se incrementa”. Se considera que el postulado de Hebb se ve representado por la LTP, la cual se define como el incremento prolongado de la eficiencia sináptica, representada como una mayor amplitud de los potenciales postsinápticos excitadores (PPSE), debido a la estimulación repetitiva (de alta frecuencia) de las aferentes a un área determinada del sistema nervioso.

La LTP fue reportada por primera vez en 1973 por Bliss y Lømo, ellos encontraron que al aplicar breves trenes de alta frecuencia a las aferentes excitatorias del hipocampo se originaba un fortalecimiento de la transmisión sináptica (es decir, este incremento en la pendiente de los PPSE) que podía durar por días y aún por horas en animales intactos (Bliss y Lømo, 1973). Desde entonces, la LTP se ha convertido en el modelo experimental primario para examinar los mecanismos sinápticos del aprendizaje y la memoria.

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

La especificidad se refiere a que solamente aquellas fibras que fueron activadas por el estímulo de alta frecuencia van a presentar modificaciones en la respuesta sináptica. La cooperatividad se manifiesta por un fuerte requerimiento en la activación simultánea de fibras presinápticas, de tal modo que se logre el estímulo necesario para activar



la LTP. Finalmente, la asociatividad se ha observado cuando una vía que ha sido estimulada por una señal de baja frecuencia puede ser potenciada si se activa al mismo tiempo que otra vía estimulada por una señal de alta frecuencia, siempre y cuando ambas sean convergentes a la misma área (Bliss y Collingridge, 1993). Para Hebb, la memoria debía ser almacenada a través de la formación de conexiones asociativas entre las neuronas involucradas, sin embargo, se ha observado la existencia de eventos de LTP descritos como no asociativos. La LTP que requiere una activación coincidente de los elementos pre y postsinápticos es llamada LTP hebbiana, mientras que aquella que requiere la activación de cualquiera de dichos elementos es referida como no-hebbiana (Urban y Barrionuevo, 1991).

#### ***V b. LTP en la Neocorteza***

La LTP fue descrita inicialmente en el hipocampo y ha sido en esta región del cerebro donde se han efectuado la mayoría de los trabajos realizados en el área. El hipocampo es una estructura paleocortical del diencefalo, que a diferencia de la neocorteza, solo posee tres estratos laminares: el estrato polimórfico, el estrato piramidal y el estrato molecular. El hipocampo recibe aferentes de diversas regiones del cerebro, principalmente de la corteza entorrinal, el septum y el hipocampo contralateral. Un aspecto sobresaliente en el hipocampo es la estructuración del circuito trisináptico, que posee circuitos planares con la misma secuencia de un circuito básico, lo que ha facilitado el estudio de las propiedades *in vitro* del circuito (Fernández-Espejo, 1996). El circuito trisináptico permite la inducción de la LTP en sus vías aferentes, a saber: de la vía perforante a las células granulares del giro dentado, de las granulares del giro dentado a las células piramidales de la región CA3 vía fibras musgosas y de CA3 a la región CA1 vía las colaterales de Schaffer (Madison y col, 1991). Estudios clínicos de disfunción hipocámpica como

el de H.M., así como modelos de experimentación con animales (Squire y Zola -Morgan, 1991; O'keefe y Conway, 1978; Volpe y col, 1992; Olsen y col, 1994) confirman la destacada labor del hipocampo en los procesos de aprendizaje y memoria, por tanto no es de extrañar que sea aquí donde se han centrado frecuentemente los estudios de la LTP (Bliss y Lømo, 1973; Derrick y col, 1991; Bliss y Collingridge, 1993; Nicoll y Malenka, 1995; Debanne y col, 1996; Abraham y Huggett, 1997).

Si bien se tiende a considerar a la neocorteza como el lugar donde tiene su asiento final la memoria a largo plazo, los trabajos encaminados al estudio de la LTP neocortical han enfrentado una complejidad mayor. Es necesario considerar el que en la neocorteza los tipos celulares y las vías aferentes presentan una mayor segregación, lo cual dificulta la interpretación de los registros de campo, así como la inducción de PPSE de una vía aferente bien definida (Bounomano y Merzenich, 1998). Esto ha originado el que una cantidad significativa de estudios apliquen protocolos de inducción de la LTP distintos a los utilizados en el hipocampo. Por ejemplo, en la corteza visual de rata y gato parece existir una dependencia entre la edad del animal y la capacidad de inducción de la LTP, así como la necesidad de ampliar la gama de frecuencias y el número de estimulaciones tetánicas, por ejemplo, si en el hipocampo basta con la aplicación de estímulos de 10 a 400 Hz por tiempos de 0.2 a 10 segundos para robustecer la respuesta sináptica, en la neocorteza se han empleado tiempos de hasta una hora con frecuencias tan bajas como 2 Hz; en numerosos casos ha sido necesario también el uso de bicuculina para inhibir la acción GABAérgica, el principal sistema inhibitorio de la neocorteza (Tsumoto, 1991; Bear and Kirkwood, 1993).

No obstante éstas complicaciones, la presencia de LTP en la neocorteza es un hecho comprobado y cada día se incrementa el número de regiones en las que ha sido posible inducirla, como la corteza visual primaria de gato (Komatsu y col, 1981,1988) y rata (Artola y Singer, 1990), la corteza somatosensorial en gato (Lee y col, 1991), corteza motora en

gato (Keller y col, 1990), la corteza prefrontal en rata (Hirsch y Crepel, 1990) y recientemente en la corteza insular (Escobar y col, 1998). De manera simultánea, la caracterización anatómica y fisiológica de las vías que confluyen a la neocorteza facilita de manera importante este trabajo.

#### ***V c. LTP de la conexión del núcleo basolateral amigdalino a la corteza insular.***

Como se expresó en líneas anteriores, la participación de la CI en los procesos de aprendizaje y memoria es decisiva, en particular en pruebas de aprendizaje motivadas aversivamente como el CAS y la prevención pasiva (Escobar y col, 1989; Bermúdez-Rattoni y col, 1995). En la actualidad, se tiene un conocimiento claro de las aferencias que recibe esta estructura, siendo de particular interés las provenientes del núcleo basolateral amigdalino (Bla) (Krettek y Price, 1974; Escobar y col, 1989; Bermúdez-Rattoni y col, 1991; Bermúdez-Rattoni y col, 1997). Por otra parte, la inducción de la LTP en la amígdala se encuentra bien documentada y de hecho, existe una clara caracterización del circuito sináptico que participa en el flujo de información durante el condicionamiento al miedo (Rogan y col, 1997; Maren, 1996). Ambas estructuras, la CI y la amígdala contribuyen a la formación y retención de la memoria asociada al malestar gástrico (Bermúdez-Rattoni y McGaugh, 1991; Bermúdez-Rattoni y col, 1997). Recientemente, Escobar y colaboradores (1998) lograron inducir la LTP *in vivo* en la CI mediante la estimulación de alta frecuencia de las aferentes provenientes del Bla, el incremento en la respuesta sináptica de esta vía se conserva por un periodo de por lo menos una hora y su inducción puede ser bloqueada por la aplicación de antagonistas a los receptores glutamatérgicos de tipo NMDA, como el CPP (ácido -3(-2 carboxipiperazin-4-yl)-propil-1-posfónico) y el MK-801 (maleato de dizocilpina). Resultados similares fueron hallados por Jones y colaboradores (1999). Cabe mencionar el que no fue necesaria

la aplicación de inhibidores GABAérgicos para obtener este incremento en la respuesta sináptica. Estos resultados son de particular interés en cuanto a que demuestran que las modificaciones en la eficiencia sináptica dependiente de actividad, un presunto mecanismo del aprendizaje y la memoria, están presentes en la región cortical, sugiriendo que la LTP de la vía Bla-CI constituye un posible mecanismo para las funciones mnémicas realizadas por la CI.

## **VI.- Participación de los receptores glutamatérgicos en la LTP neocortical.**

Debido a que la LTP se considera como un modelo experimental representativo de los procesos que subyacen al almacenamiento de información, es necesario conocer los eventos celulares que dan lugar a la formación de la LTP.

### ***VI a. Receptores glutamatérgicos de respuesta sináptica excitadora.***

El sistema nervioso se mantiene en un estado de comunicación constante cuyo código de comunicación radica en las modificaciones de las propiedades eléctricas de los estímulos que emiten y reciben las neuronas. Los neurotransmisores son las moléculas responsables en un alto porcentaje de la comunicación neuronal, representados por una amplia diversidad de moléculas entre las que se incluyen aminos biogénicas, péptidos, gases y aminoácidos (Siegel, 1994). En concordancia con los objetivos del presente trabajo nos orientamos al estudio de un tipo particular de neurotransmisor, el glutamato (Fig. 9).

El glutamato es un aminoácido preponderantemente excitador y su actividad como neurotransmisor se conoce desde mediados de la década de 1950's (Krnjević, 1986). Es ampliamente reconocida la participación de los receptores a glutamato en los eventos excitadores de transmisión

rápida del SNC de los vertebrados, en eventos de plasticidad sináptica en el desarrollo cerebral y en el cerebro adulto, así como en desórdenes neurológicos asociados a excitotoxicidad o enfermedades neurodegenerativas como la Corea de Huntington (Cotman y Monaghan, 1988; Meldrum y Garthwaite, 1990; Ben-Ari y col, 1997).

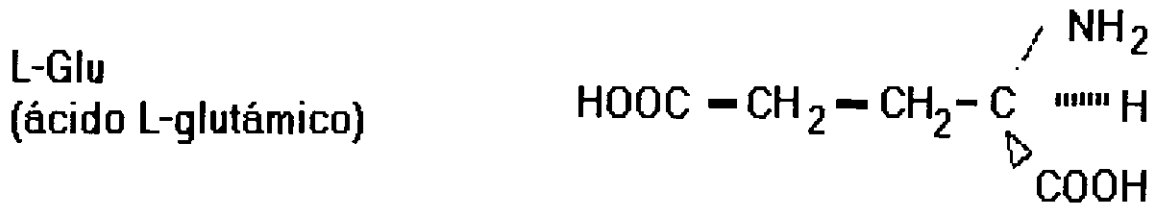


Figura 9. Estructura química del glutamato

Existen diferentes tipos de receptores glutamatérgicos, por lo general suelen ser clasificados en dos grandes categorías, receptores ionotrópicos si su estructura está asociada a canales iónicos, o metabotrópicos si se acoplan a proteínas G y adenilato ciclasa cuya activación da lugar a cascadas de transducción en el interior de la célula. Los receptores ionotrópicos son clasificados a su vez en receptores de tipo NMDA (N-metil-D-Aspartato) y de tipo no-NMDA, conformados por los receptores de tipo AMPA (ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico) y los de tipo KA (ácido kainico) (Fig. 10) (Watkins y col., 1990).

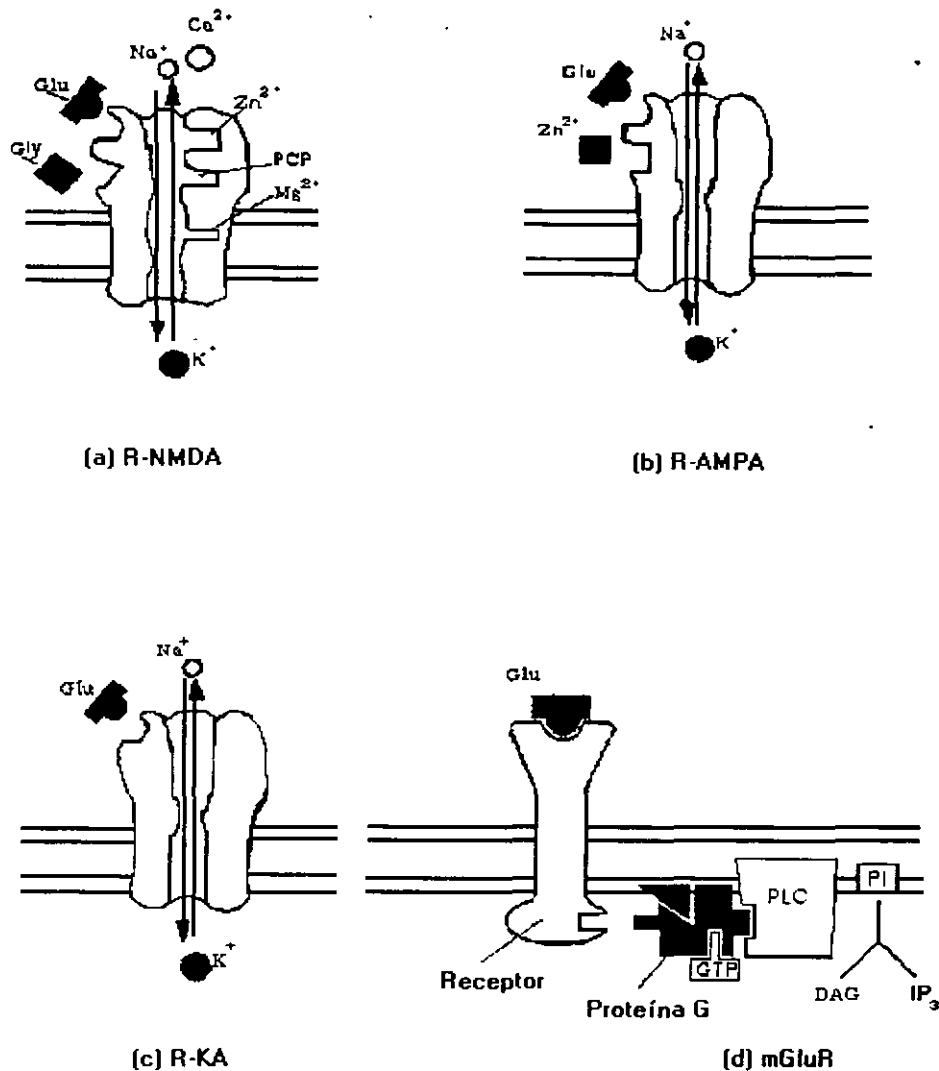


Figura 10. Representación esquemática de los receptores glutamatérgicos

Cada uno de estos receptores recibe su nombre en función de los agonistas específicos con los que fueron caracterizados inicialmente. En cuanto a los receptores metabotrópicos, también solían ser identificados por agonistas como el trans-ACPD (trans-1-aminociclopentano-1,3-dicarboxilato) y el L-AP4 (ácido L-2-amino-4-fosfonobutanóico), pero en la actualidad la clasificación más aceptada para este tipo de receptores se ha establecido en base a estudios moleculares y bioquímicos a los que se hará referencia más adelante (Pin y Duvoisin, 1995). A continuación se hará

quisqualato fue relegado al descubrirse que este agonista interactuaba con mayor afinidad con los receptores a glutamato de tipo metabotrópico. El término R-AMPA cobró vigencia en virtud de la mayor afinidad que estos receptores presentan ante el agonista  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA) (Monaghan y col., 1989).

Los R-AMPA poseen cuatro subunidades denominadas GluR-A, GluR-B, GluR-C y GluR-D, cada una de las cuales puede existir en dos formas alternativas designadas como *flip* y *flop*, que obedecen a su orientación estereoisómera (Sommer y col, 1990). El radio de permeabilidad del canal iónico de los R-AMPA permite el paso del  $\text{Na}^+$ , aunque existen trabajos que reportan una relativa permeabilidad al  $\text{Ca}^{+2}$  asociada a la presencia de la subunidad GluR-B (Hume y col, 1991)

Una propiedad distintiva de los R-noNMDA es su rápida desensibilización al glutamato, lo cual podría explicarse como una medida de protección contra la excitotoxicidad. La desensibilización de los R-AMPA es más rápida que en los R-KA (Bettler y Muller, 1995). Yamada y Tang (1993) reportan que las benzotiadiazidas inhiben la desensibilización de estos receptores.

Se considera que los R-AMPA y los R-KA son responsables del componente independiente de voltaje de la respuesta sináptica. El flujo de la corriente eléctrica entra inicialmente por los R-noNMDA (Herrón, 1985). Se ha comprobado que la presencia de los antagonistas de los R-NMDA no afecta la inducción de los PEPS de la respuesta basal, precisamente porque estos dependen de los R-AMPA y probablemente también de los R-KA (Herrling y col, 1985).

Los primeros agonistas reconocidos para los receptores a glutamato de tipo kainato (**R-KA**) son el ácido kainico (extraído del alga *Diosgenea simplex*) y el domoato (Barnes y Henley 1992). Los R-KA son estructuras heterómeras constituidas por cinco tipos diferentes de subunidades; las llamadas KA1 y KA2 tienen una alta afinidad al kainato, y las otras tres

denominadas GluR5, GluR6 y GluR7 tienen baja afinidad por el mismo (Miller, 1991).

Estudios autorradiográficos, utilizando el marcador radioactivo (<sup>3</sup>H)Kainato (Monaghan y Cotman, 1982), e inmunohistoquímicas revelan que los R-KA se distribuyen en el estriado, el núcleo talámico reticular, el hipocampo (particularmente en las células granulares del giro dentado y región CA3), en las capas profundas de la corteza cerebral y las células granulares del cerebelo (Petralia, 1997) (Fig. VI a-3).

Los R-KA son modulados por lectinas como la concanavalina A que bloquea la desensibilización, y por la fosforilación dependiente del AMPc, lo cual incrementa la corriente del R-KA (Huettner, 1997).

Se ha propuesto la participación de los R-KA en procesos neurales tan diversos como la nocicepción, la inflamación neurogénica, el desarrollo neuronal y como reguladores de la liberación de transmisores en la pre-sinapsis (Represa, 1987).

En cuanto a los receptores metabotrópicos, Sladeczek y colaboradores (1985) demostraron que el glutamato y el quisqualato estimulaban la hidrólisis de fosfoinosítidos en cultivos neuronales del estriado, mientras que el kainato y el NMDA fueron significativamente menos potentes para reproducir esta respuesta, lo cual indicaba la presencia de un tipo diferente de receptor a glutamato ligado directamente a un sistema de segundos mensajeros. Monaghan y colaboradores hacen referencia en 1989 a este tipo de receptores glutamatérgicos poco conocidos hasta ese entonces. Estos receptores se acoplaban al metabolismo de los fosfoinosítidos y fueron designados inicialmente con el nombre del agonista trans-ACPD, el cual activaba la formación del inositoltrifosfato. Los mismos autores también hacen referencia a los receptores de tipo L-AP4, estudiados principalmente en la retina. Actualmente se conoce que ambos tipos de receptores ACPD y L-AP4 forman parte de la familia de receptores metabotrópicos a glutamato (**mGluRs**).



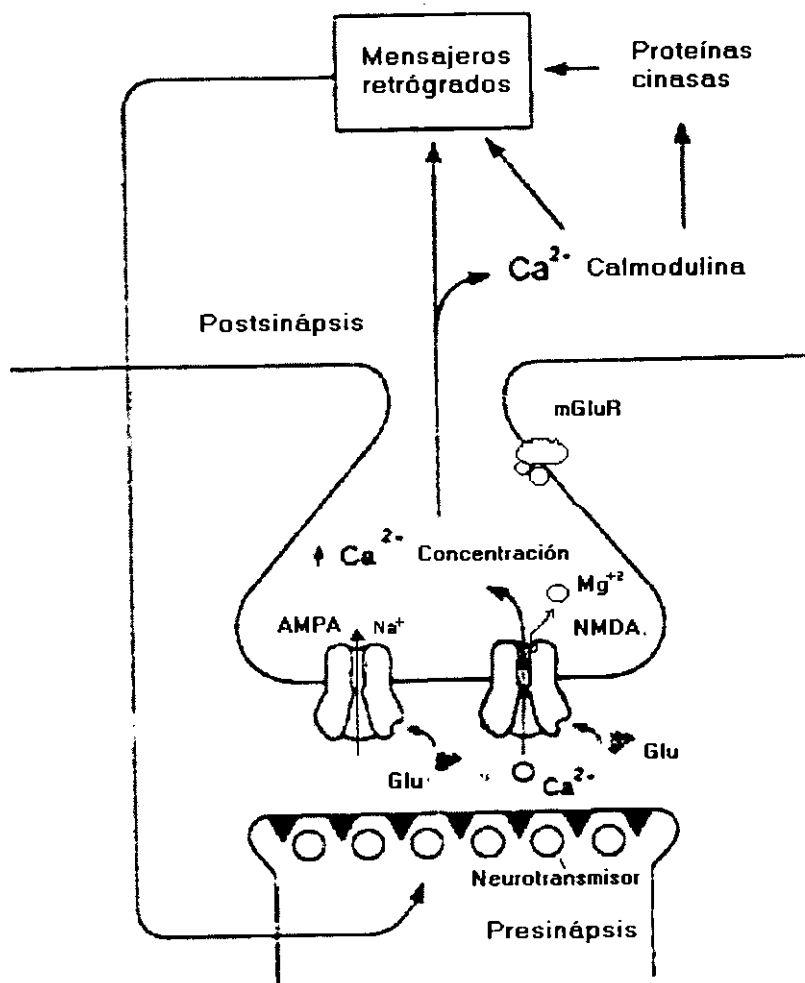
## **VI b. Participación de los receptores glutamatérgicos en la inducción de la LTP**

La transmisión sináptica excitadora se regula principalmente por los receptores glutamatérgicos, por tanto, es predecible su participación durante la inducción de la LTP. La participación de los R-NMDA en la inducción de la LTP de algunas regiones del hipocampo y de la neocorteza ha sido ampliamente documentada (Collingridge y Bliss, 1987; Bear y Kirkwood, 1993; Urban y col, 1996; Escobar y col, 1998; Jones y col, 1999), sin embargo, existen algunos tipos de LTP cuya inducción es independiente de la activación del R-NMDA, como es el caso de los dependientes de péptidos opioides. Derrick y colaboradores (1991) reportan dos tipos de LTP cuya inducción es independiente del R-NMDA, la LTP $\mu$  y la LTP $\delta$ , localizadas en la vía que va de las fibras musgosas a la región CA3, y la procedente de la vía perforante lateral al giro dentado.

Actualmente, la cascada de eventos generada durante la inducción de la LTP dependiente de la activación de los R-NMDA está mejor caracterizada. Se ha demostrado que durante la transmisión sináptica que tiene lugar ante un estímulo de baja frecuencia se libera glutamato procedente de la presinapsis. Este neurotransmisor activa a los receptores de tipo AMPA ubicados en la postsinapsis, permitiendo la entrada de sodio y en consecuencia la generación de un PPSE. La presencia de antagonistas al R-AMPA bloquea esta señal (Blake y col, 1988). Hasta este momento la participación de los R-NMDA es mínima debido a su lenta activación cinética, a la obstrucción de su canal iónico por el Mg<sup>+2</sup> y a que dicho bloqueo se intensifica por la inhibición sináptica mediada por el ácido y aminobutírico (GABA) que interactúa con los receptores a GABA de tipo A y B ubicados en la postsinápsis. La señal evocada durante este periodo permanece inalterada ante la aplicación de antagonistas de los R-NMDA. Esta situación cambia notablemente cuando la estimulación se transmite a una alta frecuencia, al permanecer activos los R-AMPA, la neurona se mantiene en estado de depolarización el tiempo suficiente para liberar al

canal del R-NMDA del bloqueo que efectúa el ion magnesio (Nowak y col, 1984) (Fig. 13). La contribución del R-NMDA en el incremento de los PPSE se deriva del ingreso de altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior celular (Bliss y Collingridge, 1993). La aplicación de antagonistas de los R-NMDA poco antes de la inducción de la LTP bloquea este fenómeno (Malenka y col, 1992).

## Inducción de la LTP



Gráfica 13. Inducción de la LTP. Ante la estimulación tetanizante, se libera el ión magnesio que bloquea la activación del R-NMDA, permitiendo así el paso del  $\text{Ca}^{2+}$  e incrementando su concentración en la célula postsináptica. Este incremento de calcio activa a diversas proteínas cinasas movilizandando una cascada de eventos metabólicos dirigidos a robustecer la actividad sináptica.

El calcio actúa como segundo mensajero y toma parte en la activación del metabolismo celular. Se ha demostrado que bloqueadores de los canales de calcio, así como quelantes del mismo ion, son capaces de reducir significativamente la LTP o bien impedirle en su totalidad (Teyler y col, 1994; Colino y Malenka, 1993; Malenka y col, 1988; Lynch, 1977). Estudios en los que se utilizaron compuestos fluorescentes sensibles al  $\text{Ca}^{+2}$  reportaron un incremento importante en la concentración del  $\text{Ca}^{+2}$  en la postsinapsis como consecuencia de la estimulación de alta frecuencia (Regehr y Tank, 1992; Perkel, 1993).

La LTP se consolida como un mecanismo perdurable durante el proceso subsecuente a la inducción, el cual consta de tres fases conocidas como inicial, temprana y tardía (Roberson y col, 1996). Se reconoce que el breve pero trascendental incremento de  $\text{Ca}^{+2}$  en la espina dendrítica actúa como un interruptor capaz de activar la función de proteínas cinasas (Malenka, 1989). En consecuencia la aplicación de inhibidores de las cinasas bloquea la expresión de la LTP, particularmente en el periodo comprendido entre 1 a 3 horas después de la inducción (Reymann y col, 1988; O'Dell y col, 1991). Algunas proteínas cinasas son capaces de fosforilar a otras proteínas de forma tal que su actividad se vuelva más eficiente. Por ejemplo, Benke y colaboradores (1998) reportan que el fortalecimiento de la actividad sináptica puede ser el resultado de un incremento en la conductancia del canal iónico de los R-AMPA, debido a su fosforilación. Precisamente, Barria y colaboradores (1997) describen que la activación de la proteína cinasa de tipo II dependiente de calcio-calmodulina (CaM-KII) se correlaciona con un aumento en los niveles de fosforilación de los R-AMPA y que el bloqueo de la actividad del CaM-KII impide dicha fosforilación. Para que las modificaciones de la transmisión sináptica trasciendan por periodos prolongados de tiempo, se ha sugerido la dependencia de mecanismos como son la síntesis de nuevas proteínas, por ejemplo, para incrementar el número de receptores a glutamato (Nayak y col, 1998) o mediante la expresión de formas alternativas de las mismas,

como podría suceder en el caso de los R-AMPA (Sommer y col, 1990). Si la transcripción de ARNm o la traducción de las proteínas involucradas en estos eventos es bloqueada, el efecto de la potenciación decae después de una determinada ventana de tiempo (Otani y Abraham, 1989). Aún no es del todo claro si las modificaciones en la transcripción se desarrollan en la pre- o en la postsinapsis, debido a que se ha observado un incremento en la amplitud de los cuanta de neurotransmisor liberados después de un evento de LTP (Liao y col, 1992), para explicar esto se ha propuesto la participación de moléculas que actúen como mensajeros retrógrados y que sean capaces de activar una respuesta de esta naturaleza en la presinápsis. Entre los mensajeros retrógrados propuestos se encuentran el ácido araquidónico y el óxido nítrico (Sommer y col, 1990).

Ulteriormente se ha propuesto que la LTP involucra modificaciones anatómicas, como pudiese ser el desarrollo de nuevos brotes de espinas dendríticas (Ben-Ari y Represa, 1990) o la emisión de nuevas proyecciones axónicas en las sinapsis estimuladas (Escobar y col, 1997). En estos eventos se ha demostrado también la importancia de factores tróficos tales como el factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF) y el factor de crecimiento neuronal (NGF), cuya transcripción se incrementa tras la inducción de la LTP (Morimito, 1998).

Con este conjunto de datos es posible esbozar un modelo molecular que nos permita comprender el establecimiento y mantenimiento de las modificaciones sinápticas subsecuentes a la activación del SNC.

Dado el reciente descubrimiento de los distintos tipos de mGluRs y el aún más reciente perfeccionamiento de antagonistas específicos a cada tipo de mGluR, el conocimiento que se tiene acerca de su participación en la LTP aún resulta escaso, pero se mantiene en constante desarrollo. La participación de este tipo de receptores en la LTP es materia de controversia entre diferentes grupos de investigación. Bashir y col. (1993) y Riedel y col (1996) encontraron que la aplicación del antagonista a los mGluR I, el MCPG ((RS)- $\alpha$ -methyl-4-carboxifenilglicina), bloqueaba la

inducción de la LTP hipocampal. Los experimentos subsecuentes por parte de otros grupos como los de Chinestra y col. (1993), Manzoni y col. (1993) y Selig y col. (1995) no han tenido éxito en reproducir estos resultados. Ellos reportan que la aplicación del MCPG no logró bloquear la inducción de la LTP hipocampal. Izumi y Zorunski (1994) reportan que el MCPG logra bloquear la LTP en ratas jóvenes, pero no en animales adultos. Ante estos resultados se ha propuesto que este tipo de receptores actúen como moduladores del umbral de activación de la LTP influenciando, por ejemplo, la función de los R-NMDA (Ben-Ari y col, 1992), o bien, incrementando los niveles de  $Ca^{+2}$  intracelular al liberarlo de los reservorios internos a través de la participación del IP3, lo que podría sugerir una función relevante de los mGluR durante los eventos de consolidación de la LTP más que con aquellos que intervienen en su inducción (Fotuhi y col, 1994)(Figura 14).

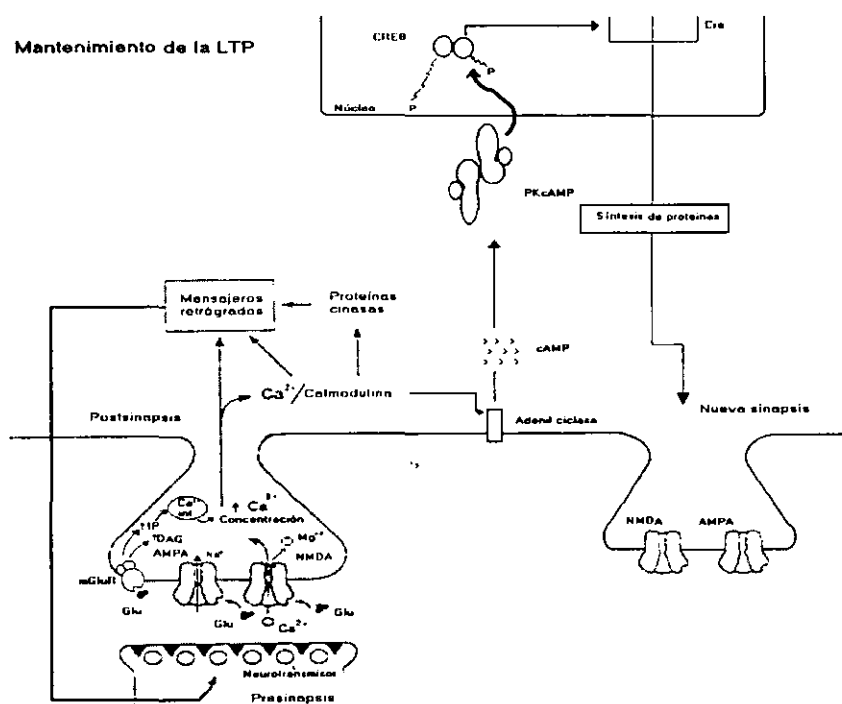


Figura 14. Mantenimiento de la LTP. El incremento de calcio como resultado de la inducción de la LTP promueve un complejo mecanismo metabólico responsable de la etapa de mantenimiento de la LTP.

## **VII.- Correlatos conductuales de la LTP**

### ***VII a. Diferentes aproximaciones para un mismo fin***

La LTP figura como el modelo de plasticidad sináptica más representativo para el almacenamiento de información en el sistema nervioso central de mamíferos, debido a su persistencia en el tiempo, su concordancia con las predicciones hechas por Hebb y por la correspondencia que presenta con ciertos requerimientos celulares y moleculares necesarios durante los procesos mnémicos (Martínez y Derrick, 1996). Determinar qué tan estrecha es la equivalencia de los mecanismos propios de la LTP con aquellos relacionados a la adquisición y el almacenaje de información en los seres vivos resulta relevante en el área de las neurociencias. Dada la complejidad del problema, ha sido necesario abordarlo desde diferentes perspectivas tales como la electrofisiológica, la molecular y la farmacológica.

En el ámbito de los trabajos electrofisiológicos surgen al menos dos grandes líneas de investigación, la primera busca determinar si durante el aprendizaje se inducen cambios sinápticos similares a la LTP y, la segunda, si la LTP influye en la adquisición del aprendizaje.

Sharp y colaboradores (1985) reportaron modificaciones de la transmisión sináptica similares a la LTP originadas por aprendizaje, ellos descubrieron que la actividad de exploración originaba un incremento en la población de los PPSEs de la vía perforante del giro dentado, lo cual fue denominado como modulación exploratoria a corto plazo (STEM, por sus siglas en inglés). El STEM podía ser bloqueado por antagonistas de los R-NMDA, sin embargo solo duraba de 20 a 40 minutos. Estudios posteriores demostraron que la STEM mantenía una relación más estrecha con las fluctuaciones de la temperatura cerebral que con los procesos cognitivos (Moser y col, 1993). En otro estudio, Green y Greenough (1986) registraron una mayor pendiente de los PPSEs de la vía perforante del giro dentado en

rebanadas de cerebro de ratas introducidas en “ambientes enriquecidos” en comparación con los registros obtenidos de grupos control o de “ambientes empobrecidos”. Mitsuno y colaboradores (1994) han reportado un incremento notable en los PPSEs de campo de las fibras musgosas durante el transcurso del aprendizaje de un laberinto radial. Roman y colaboradores (1987) obtuvieron una respuesta monosináptica sustancialmente potenciada en la corteza piriforme como resultado de la estimulación del tracto olfatorio lateral a manera de señal discriminativa (estos estímulos son interpretados como la percepción sensoria de un aroma determinado) en una prueba de discriminación entre dos olores. La señal registrada tuvo una duración superior a las 24 horas. Rogan y colaboradores (1997) aportan una de las evidencias más sólidas hasta el momento a favor de la relación entre la LTP y el aprendizaje. Este grupo obtuvo en sus resultados modificaciones en la facilitación de la respuesta sináptica ante pares de pulsos aplicados en la vía del núcleo geniculado medial del tálamo a la amígdala lateral, sugiriendo que el condicionamiento al miedo puede causar incrementos en la eficiencia sináptica a largo plazo.

En cuanto a cómo se afecta la adquisición del aprendizaje a causa de la inducción de la LTP, los experimentos sobre “saturación” han cobrado gran relevancia en la actualidad. La LTP presenta requerimientos bioquímicos y celulares comunes a la adquisición y la preservación de la memoria, por lo que cuando la LTP es inducida es posible considerar que utilice dichos elementos para sí, sin dejar recursos disponibles para la adquisición de un nuevo aprendizaje. Cuando una vía es saturada se encuentra en un estado en el que es imposible una potenciación posterior (Moser y col, 1998). La saturación ha sido reportada en pruebas de aprendizaje espacial como el laberinto circular y el laberinto de agua de Morris (McNaughton y col, 1986; Castro y col, 1989, respectivamente) al estimular las fibras del haz angular del complejo hipocampal. Algunos grupos trataron de reproducir el fenómeno sin éxito debido a lo difícil que

resultaba estimular la totalidad de fibras de una vía neural en particular (Korol y col, 1993; Barnes y col, 1994). Recientemente Moser y colaboradores (1998) lograron saturar la vía perforante del giro dentado utilizando dos electrodos bipolares a ambos lados del haz angular y un electrodo bipolar en medio del mismo, creando de este modo un amplio campo de estimulación capaz de saturar a la mayoría de las fibras del haz (Fig. 15). Una vez saturada la vía, se observó un pobre desempeño en la realización del laberinto de agua.

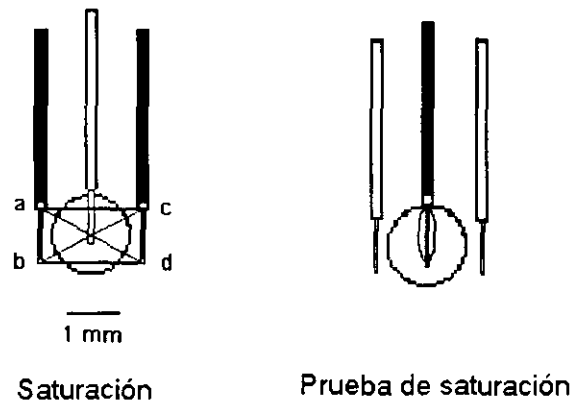


Figura 15. Sistema de electrodos utilizado en el modelo de saturación diseñado por Moser y colaboradores. Los electrodos forman un campo de estimulación lo suficientemente amplio como para abarcar la mayoría de las fibras involucradas en la vía aferente seleccionada.

De índole diferente a los trabajos de saturación, Escobar y Bermúdez-Rattoni (2000) mostraron que la inducción de la LTP en la vía Bla-CI, previa al entrenamiento del CAS, incrementa el periodo de retención de esta tarea.

En el área de la biología molecular se han registrado importantes avances en el estudio de la vinculación entre la conducta y la LTP, particularmente en investigaciones realizadas con ratones genéticamente modificados conocidos como mutantes “knockout” (KO). En las primeras investigaciones efectuadas con ratones mutantes KO, los genes que codifican la generación de proteínas cinasas tipo II dependientes de



calcio/calmodulina (CAM-KII) fueron eliminados (Silva y col, 1992a y b). En estos mutantes tanto la LTP evocada en la región CA1 del hipocampo como la habilidad de resolver el laberinto de agua de Morris se redujeron considerablemente. Hay que considerar que la incapacidad de expresar la CAM-KII no pudo restringirse al área cerebral de estudio, por lo que es posible pensar en el mal funcionamiento de otras funciones ajenas al proceso de aprendizaje, además de posibles daños en su desarrollo cerebral. Abeliovich y colaboradores (1993a y 1993b) reportan que al estimular las colaterales de Shaffer en ratones mutantes “knock-out” de la proteína cinasa C subtipo  $\gamma$ , la LTP evocada en CA1 resultó notablemente reducida mientras que el aprendizaje espacial (en laberinto de agua) y el contextual (condicionamiento al miedo) fue moderadamente deficiente. Actualmente se habla de una segunda generación de mutantes “KO” cuya modificación genética se establece en un área muy localizada y que es capaz de expresarse a un tiempo determinado, lo que permite un mayor control en este tipo de estudios (Wilson y Tonegawa, 1997, Mayford y col, 1996).

### ***VII b. Aproximaciones farmacológicas***

Los correlatos farmacológicos entre la LTP y la memoria tienen su origen en la comparación entre ambos eventos tras la administración de un fármaco determinado. Si consideramos a la LTP como un modelo de plasticidad neural dependiente de actividad cuyo fortalecimiento en la respuesta sináptica se origina a partir de acontecimientos análogos a los que dan lugar a los mecanismos de aprendizaje y memoria, es posible esperar que compartan características farmacológicas similares.

Al determinarse la trascendencia de los R-NMDA en la inducción de la LTP, se inició una nueva generación de investigaciones encauzadas a determinar la participación de estos mismos en el estudio del aprendizaje y la memoria. Uno de los trabajos más significativos en este campo fue

realizado por Morris y colaboradores (1986) al establecer un correlato farmacológico, administrando por vía cerebroventricular el ácido aminofosfonovalérico (AP5) un antagonista del R-NMDA. En el grupo de animales que recibió el AP5 se observó que la inducción de la LTP de la vía perforante al giro dentado fue totalmente bloqueada, así como que la ejecución en el laberinto de agua fue significativamente afectada al comparar este grupo tanto con el grupo control como con el grupo L-AP5 (isómero de AP5 sin efecto como antagonista de los R-NMDA). La existencia de un posible daño motor o visual fue descartada al utilizar plataformas visibles que fueron rápidamente localizadas por todos los grupos experimentales. En otra serie de experimentos, Davis y colaboradores (1992) reportaron que las concentraciones de AP5 necesarias para bloquear la LTP *in vivo* originaban significativos trastornos en el desempeño del aprendizaje espacial sin causar disturbios sensoriomotores significativos. Mediante la microdiálisis y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) fue posible determinar que la concentración registrada de AP5 *in vivo* era similar a la requerida para bloquear la LTP de CA1 en rebanadas de hipocampo *in vitro*.

Desde entonces se ha incrementado el número de trabajos que reportan la existencia de LTP dependiente de los R-NMDA en diversas áreas del cerebro mediante el uso de antagonistas tales como el AP5 y el CPP, (Morimoto y col, 1993; Hernández y col, 1994; Kudoh y Shibuki, 1994; Jay y col, 1996; Davis y col, 1997; Hrabetova y Sacktor, 1997; Escobar y col, 1998), así como pruebas de aprendizaje que se ven modificadas bajo el efecto de los mismos fármacos (Ward y col, 1993; Riekkinen y Riekkinen Jr, 1997; Roseblum y col, 1997; Gutiérrez y col, 1999). Estas investigaciones corroboran las convergencias existentes entre los mecanismos celulares que subyacen al aprendizaje y la memoria con el modelo de la LTP, lamentablemente, existen pocos correlatos directos que establezcan una equivalencia unívoca entre ambos procesos.

## VIII. Planteamiento del Problema

El abordar los procesos mnémicos a partir del estudio de las bases celulares que los sustentan nos brinda una concepción más clara de la génesis del comportamiento de los seres vivos. La LTP resulta, por tanto, una valiosa herramienta para disectar los eventos celulares implicados en la adquisición y almacenaje de la información.

La corteza insular constituye una área de la neocorteza profusamente involucrada en los procesos de aprendizaje y memoria de información gustativa y espacial (Bermúdez-Rattoni y McGaugh, 1991; Escobar y col, 1994). El conocimiento que se tiene de las vías neuronales implicadas en este proceso de información dentro de la corteza insular reviste gran interés, en particular para la exploración de la inducción de la LTP como una forma de plasticidad sináptica involucrada en los procesos mnémicos. Las aproximaciones conductuales de la LTP nos permiten evaluar dentro de un mismo contexto tanto la inducción del modelo electrofisiológico como los mecanismos celulares que tienen lugar durante la adquisición de la información, resaltando así las convergencias existentes entre ambos.

Recientemente se demostró que la estimulación tetánica del núcleo basolateral amigdalino induce LTP dependiente de R-NMDA en la corteza insular de ratas adultas (Escobar y col, 1998). A partir de este hallazgo, el presente estudio tiene como propósito estudiar la participación de los receptores glutamatérgicos en la adquisición del CAS como un paradigma de aprendizaje estrechamente relacionado a la corteza insular así como su vinculación con la inducción de la LTP de la vía Bla-CI a través de una correlación farmacológica entre ambos.

Con tal fin, nuestro estudio comprende los siguientes objetivos:

- 1.- Estudiar los efectos que ejercen los antagonistas de los receptores glutamatérgicos de tipo NMDA (AP5 y CPP) tanto en la

adquisición del CAS como en la inducción de la LTP de la vía Bla-CI *in vivo*.

2.- Examinar los efectos del antagonista a receptores metabotrópicos a glutamato tipo I, (RS)- $\alpha$ -metil-4-carboxi-fenilglicina (MCPG), tanto en la adquisición del CAS como sobre la inducción de la LTP de la vía Bla-CI *in vivo*.

3.- Determinar si los efectos producidos por CPP, AP5 y MCPG en la inducción de la LTP de la conexión Bla-CI son comparables a los observados en la adquisición del CAS.

4.- Establecer un correlato de tipo farmacológico entre la LTP de la conexión Bla-CI y el CAS en una estrecha correspondencia tanto temporal como de concentración de los antagonistas a los receptores de glutamato utilizados a través de la administración intracortical de los mismos.

5.- Evaluar y discutir los resultados obtenidos en el marco teórico existente con relación a la participación de la vía Bla-CI en la adquisición del Condicionamiento Aversivo a los Sabores entre los modelos electrofisiológico y conductual.

## **IX. Procedimiento experimental**

El presente estudio consta de dos fases experimentales. La metodología descrita para la cirugía y el CAS fue común a ambas fases y se describe a continuación.

### ***IX a. Metodología general***

#### Sujetos

Se utilizó un total de 102 ratas (79 para el modelo conductual en ambas fases y 23 para el modelo electrofisiológico, también de ambas fases) macho de la variedad Wistar con pesos de 280 a 350 g al momento de la cirugía. Los animales fueron colocados en cajas individuales de acrílico con agua y alimento *ad libitum* hasta el momento de iniciar el entrenamiento del CAS, a una temperatura aproximada de 22.5° C y un ciclo invertido de luz oscuridad de 12/12 horas.

#### Cirugía

El procesamiento quirúrgico de los sujetos se llevó a cabo utilizando procedimientos estereotáxicos convencionales y consistió en la implantación bilateral de guías cánula de acero inoxidable de 1 cm de largo y 0.022 pulgadas de calibre bajo el efecto de anestesia (Nembutal 50 mg/Kg; vía intraperitoneal). Las coordenadas empleadas fueron AP=+1.2 mm; ML=±5.0 mm; DV=-2 mm (Paxinos, 1995). Los extremos de las guías cánula fueron colocados 5mm arriba de la CI (Fig. IX a-1). Las guías cánula se fijaron al cráneo usando "acrílico dental de secado rápido". Un estilete de alambre de acero inoxidable fue colocado en el interior de las cánulas con el fin de proteger su luz de obstrucciones con material orgánico durante el periodo de entrenamiento (Fig. 16). El periodo post-operatorio tuvo una duración de una semana, tras la cual se inició el entrenamiento del CAS.

Los grupos canulados fueron infundidos intraparenquimalmente en la región correspondiente a la CI en ausencia de anestésico. Para todos los grupos, las microinyecciones fueron administradas por microinyectores

consistentes en agujas dentales de calibre 30. El microinyector fue introducido en la cánula previa remoción del estilete y se extendió 5 mm por debajo del extremo inferior de la cánula, alcanzando así la región correspondiente a la CI. Los microinyectores fueron conectados mediante tubos de polietileno a jeringas Hamilton de 10  $\mu$ l. Las microinyecciones fueron dosificadas mediante una bomba de microinfusión (Carnegie Medicin, MA) a una velocidad de flujo de 0.5  $\mu$ l/minuto. Una vez inyectado el volumen total de la solución vehículo con o sin fármaco, de acuerdo al protocolo experimental los microinyectores permanecieron durante un minuto más para asegurar la adecuada difusión de la solución en el tejido.

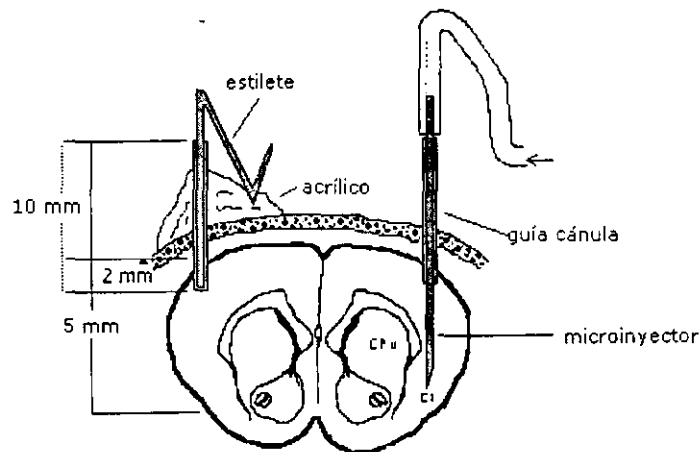


Figura 16. Esquema en un corte coronal de la posición de las guías cánulas utilizadas para la infusión de los fármacos dentro de la corteza insular. CI = corteza insular, CPU = putamen caudado.

### Condicionamiento aversivo a los sabores

El CAS inició después del periodo postoperatorio, tras el cual los animales fueron privados de agua por 24 horas. Se les entrenó para beber agua dos veces al día (11 y 18 horas) durante 10 minutos por cada sesión de entrenamiento en un periodo de cuatro días durante los cuales se estableció la línea base de consumo. Los bebederos fueron construidos con probetas graduadas cubiertas con tapones de caucho horadados con boquillas de metal. El día de la adquisición los animales fueron privados

de alimento sustituyendo el agua por un sabor novedoso (solución de sacarina al 0.1 %; Sigma, WI). Después de 10 minutos se administró una dosis intraperitoneal de cloruro de litio (LiCl 0.15 M, 7.5 ml/Kg; Baker, Mex) para inducir el malestar digestivo. El consumo de la línea base fue restablecido por cuatro días más, tras los cuales el agua fue sustituida nuevamente por la solución de sacarina 0.1 % durante la prueba de aversión. La disminución del consumo de sacarina con respecto a la ingesta de agua durante la última línea base fue usada como parámetro de la fuerza aversiva del CAS.

### ***IX b. Fase I***

Como se ha mencionado con anterioridad, los antagonistas a los R-NMDA bloquean frecuentemente la inducción de la LTP en diversas vías cerebrales, como CA3 en el hipocampo (Hernández y col, 1994), en la amígdala media (Shindou y col, 1993) y la CI (Escobar y col, 1998). El CPP es un antagonista con una alta afinidad a los R-NMDA y se ha utilizado ampliamente para bloquear la inducción de la LTP (Hernández y col, 1994; Davis y col, 1997; Hrabetova y Sacktor, 1997) así como la adquisición en diferentes paradigmas de aprendizaje (Ward y col, 1990; Riekkinen y Riekkinen Jr., 1997). Teniendo esto en consideración, el propósito de la primera fase experimental fue determinar si el antagonista a los R-NMDA, CPP, era capaz de afectar la adquisición del CAS de modo similar al que afecta a la LTP evocada en la CI. Para tal efecto, cada fase constó de una etapa de experimentación conductual y una etapa para el registro de la LTP. Durante la etapa conductual se entrenaron dos grupos de ratas canuladas: el grupo experimental (CPP) recibió una microinyección intracortical de CPP (0.03 µg por hemisferio; Tocris Cookson, Bristol, UK) disuelto en un volumen de 0.5 µl de solución de amortiguador de fosfatos-salina (PBS) pH 7.4 (concentración de CPP= 5µM) (n=8). El grupo control experimental (VEH) recibió 0.5 µl de la solución vehículo de PBS pH 7.4 por hemisferio (n=8). Se utilizó también un grupo control intacto (CON) sin

canular (n=7). Los tres grupos fueron entrenados bajo el procedimiento ya descrito para el CAS. CPP y VEH fueron inyectados una hora antes de la presentación del estímulo gustativo novedoso (la solución de sacarina al 0.1%). Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) factorial empleando la prueba post-hoc de Fisher (Ver diagrama de flujo, figura 17).

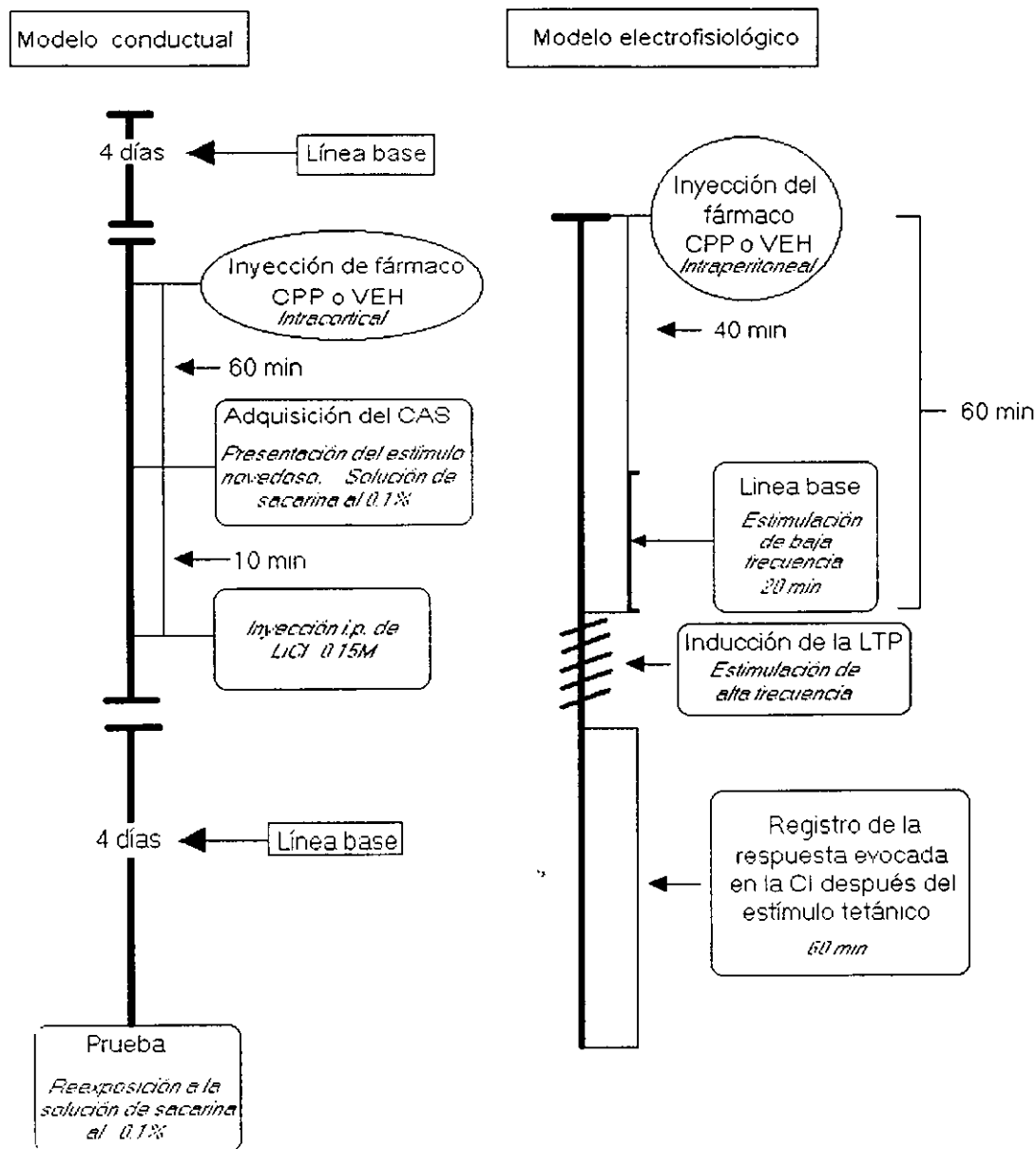


Figura 17. Diagrama de flujo del procedimiento experimental de la fase I



Los registros de la LTP fueron obtenidos a partir de grupos análogos a los utilizados para la parte conductual (CPP (n=4) y VEH (n=4)) en los cuales la inyección del fármaco (CPP, 10mg/kg; Tocris Cookson, Bristol, UK) o de la solución vehículo (PBS pH 7.4) se realizó por vía intraperitoneal una hora previa a la estimulación de alta frecuencia. La metodología empleada durante los registros de la LTP se describe en el Apéndice A.

### **IX c. Fase II**

El estudio de los receptores específicos a los mGluR es relativamente reciente, por lo que su aplicación para la determinación del papel de los mGluR en el aprendizaje, la memoria y la LTP no ha sido del todo explorada. El MCPG es un antagonista a los receptores metabotrópicos, con una alta afinidad por los mGluR de clase I. Por esto, uno de los propósitos de la segunda fase experimental consistió en examinar si el antagonista a los receptores glutamatérgicos de tipo metabotrópico MCPG afectaba tanto el CAS como la LTP evocada en la CI.

Otro de los objetivos en esta fase experimental consistió en estrechar, por un lado, el marco de correspondencia entre la concentración de los fármacos utilizados en el modelo conductual y el electrofisiológico, y por otro reducir las variantes espacio-temporales entre la participación de los receptores glutamatérgicos durante la adquisición del CAS y la LTP de la vía Bla-CI. Para tal efecto se redujo la ventana de tiempo entre el momento de la aplicación del fármaco y la presentación del sabor novedoso en la etapa de experimentación conductual, y entre la aplicación del fármaco y la estimulación de alta frecuencia para la inducción de la LTP en la CI, efectuando la administración intraparenquimal de los fármacos. Resulta importante enfatizar que en esta fase la inyección de los fármacos en los animales sometidos a la prueba electrofisiológica se aplicó *in situ*, esto es, directamente en la región intraparenquimal correspondiente a la CI.

Se examinó así mismo el efecto de dos antagonistas a los R-NMDA, el CPP que fue empleado en la fase anterior, y el AP5, cuya utilización para

determinar la dependencia de los R-NMDA en tareas conductuales (Gutiérrez y col, 1999; Morris 1989) y durante la inducción de la LTP (Bear y Kirkwood, 1993, Morris, 1989) está bien documentada.

En la etapa conductual se emplearon los grupos experimentales CPP (n=11), AP5 (n=13), MCPG (n=7) y VEH (n=13). Se utilizó también un grupo control que permaneció intacto (CON; n=12). Cada grupo recibió respectivamente, una microinyección intraparenquimal de CPP (0.03 µg en 0.5 µl por hemisferio; Tocris Cookson, Bristol, UK), AP5 (2.5 µg en 0.5 µl por hemisferio; Tocris Cookson, Bristol, UK) y MCPG (2 µg en 0.5 µl por hemisferio) 30 minutos antes de la presentación del estímulo novedoso. Las concentraciones resultantes fueron de CPP = 5µM, AP5 = 1.9 mM y MCPG = 1.8mM. Las soluciones se administraron en un volumen de 0.5µl por hemisferio a una velocidad 0.5 µl/min. El grupo VEH recibió 0.5 µl de PBS pH 7.4 por hemisferio también 30 minutos previos a la presentación del estímulo novedoso. Los cinco grupos fueron entrenados bajo el procedimiento ya descrito para el CAS. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) factorial empleando la prueba post-hoc de Fisher.

Los registros de la LTP se obtuvieron a partir de grupos análogos a los utilizados para el CAS (CPP (n=4), AP5 (n=4), MCPG (n=3) y VEH (n=4)) Las dosis y las concentraciones de fármacos administradas a cada grupo fueron las mismas que recibieron los grupos durante el CAS descrito en esta fase (Fig. 18). La administración de los fármacos se efectuó intracorticalmente 30 minutos antes de la estimulación de alta frecuencia, lo cual fue posible gracias al empleo de electrodos de microinfusión consistentes en cánulas de acero inoxidable de calibre 33, recubiertas por epoxilita, acopladas a un tubo de polietileno por medio de un anillo de acero inoxidable de calibre 26, enrollado con alambre de acero inoxidable bañado con teflón (diámetro de 0.005 pulgadas) (Fig. 19). El tubo de polietileno fue conectado a una jeringa Hamilton de 10 µl la cual, en su momento fue accionada por una bomba de microinfusión (Carnegie

Medicin, MA) a una velocidad de flujo de 0.5  $\mu\text{l}/\text{min}$ . El procedimiento utilizado para la inducción de la LTP es descrito en el apéndice A.

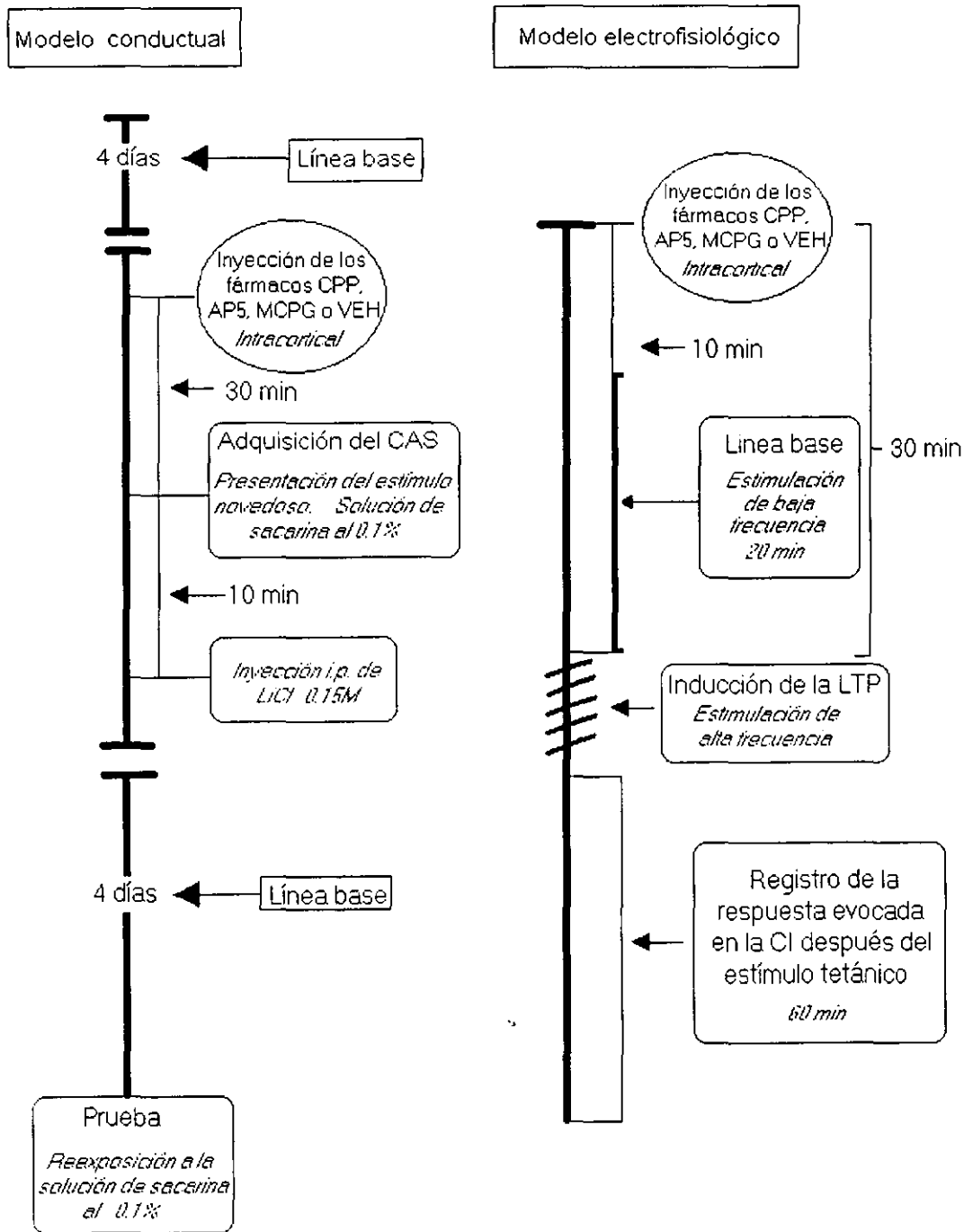


Figura IX c-1. Diagrama de flujo del procedimiento experimental de la fase II.

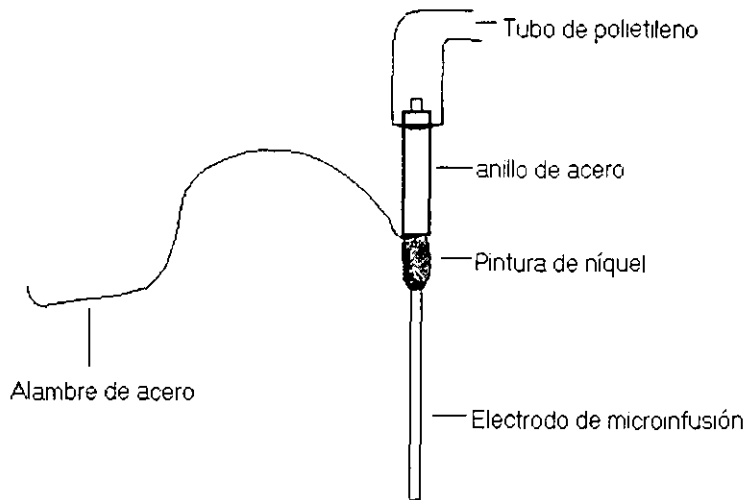


Figura IX c-2. electrodo de microinfusión utilizado para el modelo electrofisiológico de la fase II

#### **IX d. Histología**

Una vez concluida la fase conductual del experimento, los animales fueron sacrificados mediante una sobredosis del anestésico pentobarbital. Se procedió a la perfusión intracardial de los sujetos canulados con solución salina al 9% seguida por una segunda perfusión con solución fijadora de paraformaldehído 4%/ glutaraldehído 0.1% en PBS pH 7.4. Los cerebros fueron extraídos y almacenados para su postfijación en paraformaldehído 4%/ glutaraldehído 0.1% durante 24 h a 4°C. Transcurrido este periodo, fueron almacenados en una solución de sacarosa al 30% en PBS hasta que alcanzaron una densidad mayor a la de la solución. Solo entonces los cerebros fueron congelados y rebanados en cortes coronales de 40µm. Los cortes se montaron en portaobjetos de cristal bañados de gelatina y cromoalúmina.

Las muestras fueron teñidas con violeta de cresilo y examinadas en un microscopio de luz, con el fin de verificar que la posición de la punta del microinyector estuviera en la región correspondiente a la CI (Fig. 20).

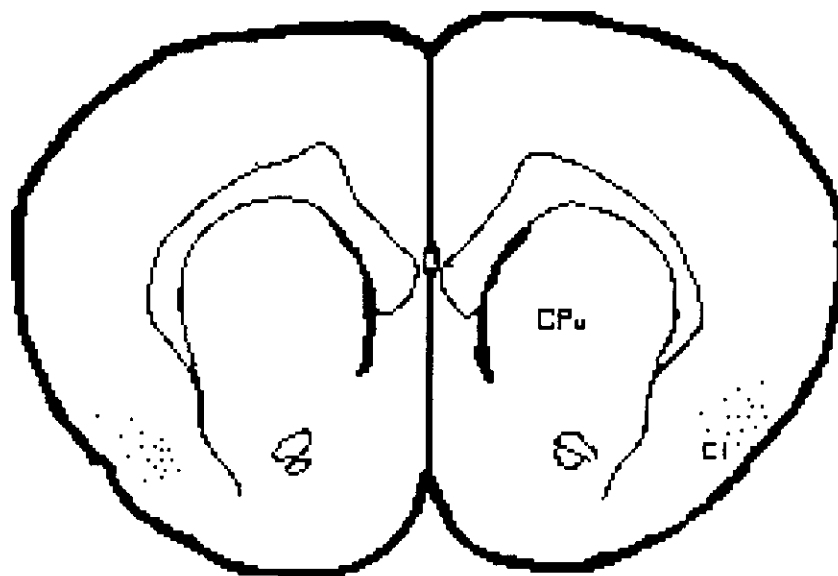


Figura 20. Diagrama de los registros histológicos. Los puntos señalan la posición de la punta de los microinyectores en la corteza insular. CI: corteza insular, CPu: putamen caudado.

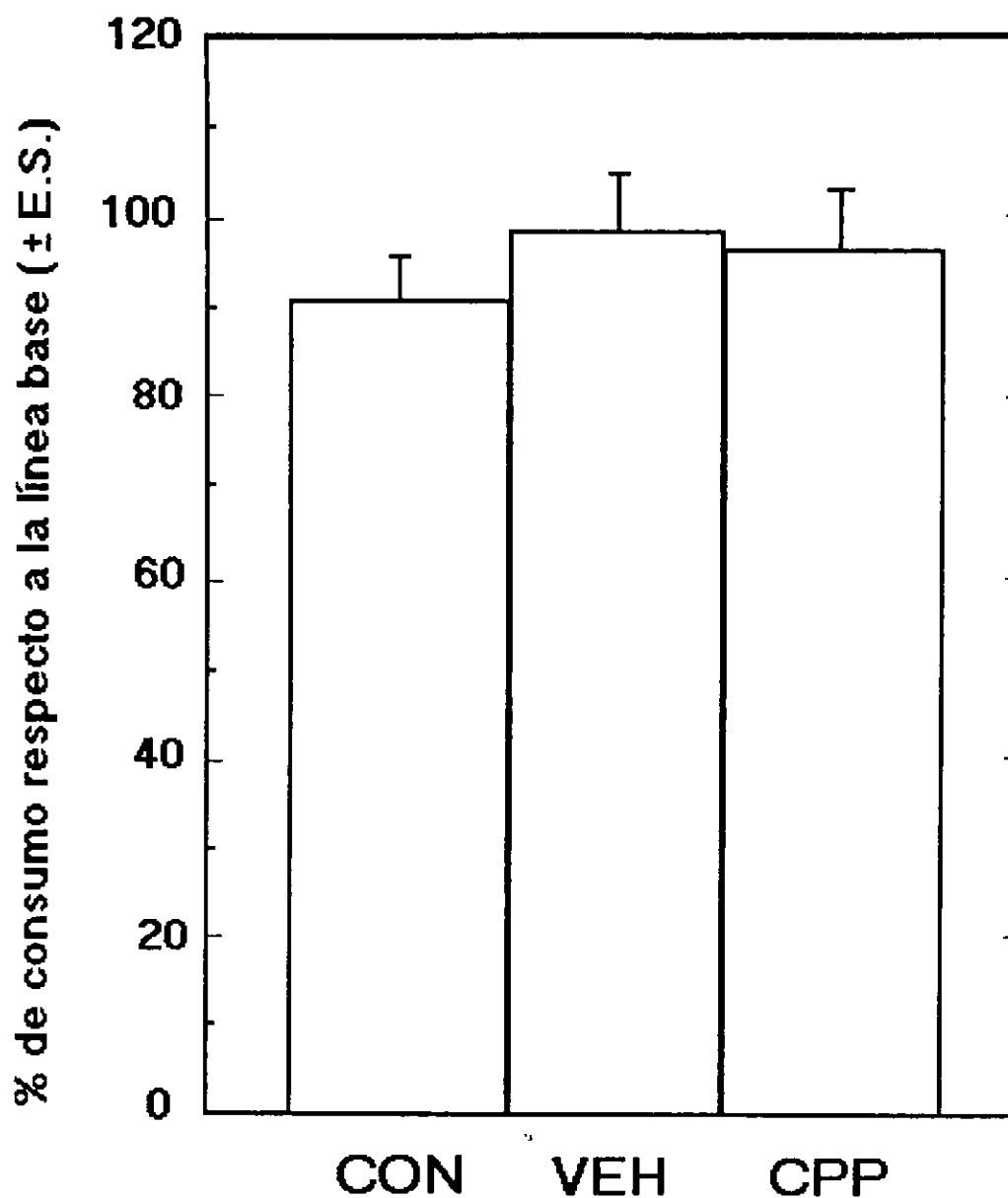
## **X.- Resultados**

### ***X a. Fase I***

No se registraron diferencias significativas entre los diferentes grupos durante el consumo base de agua ni en el consumo de la solución de sacarina durante la adquisición del CAS (Gráfica 1).

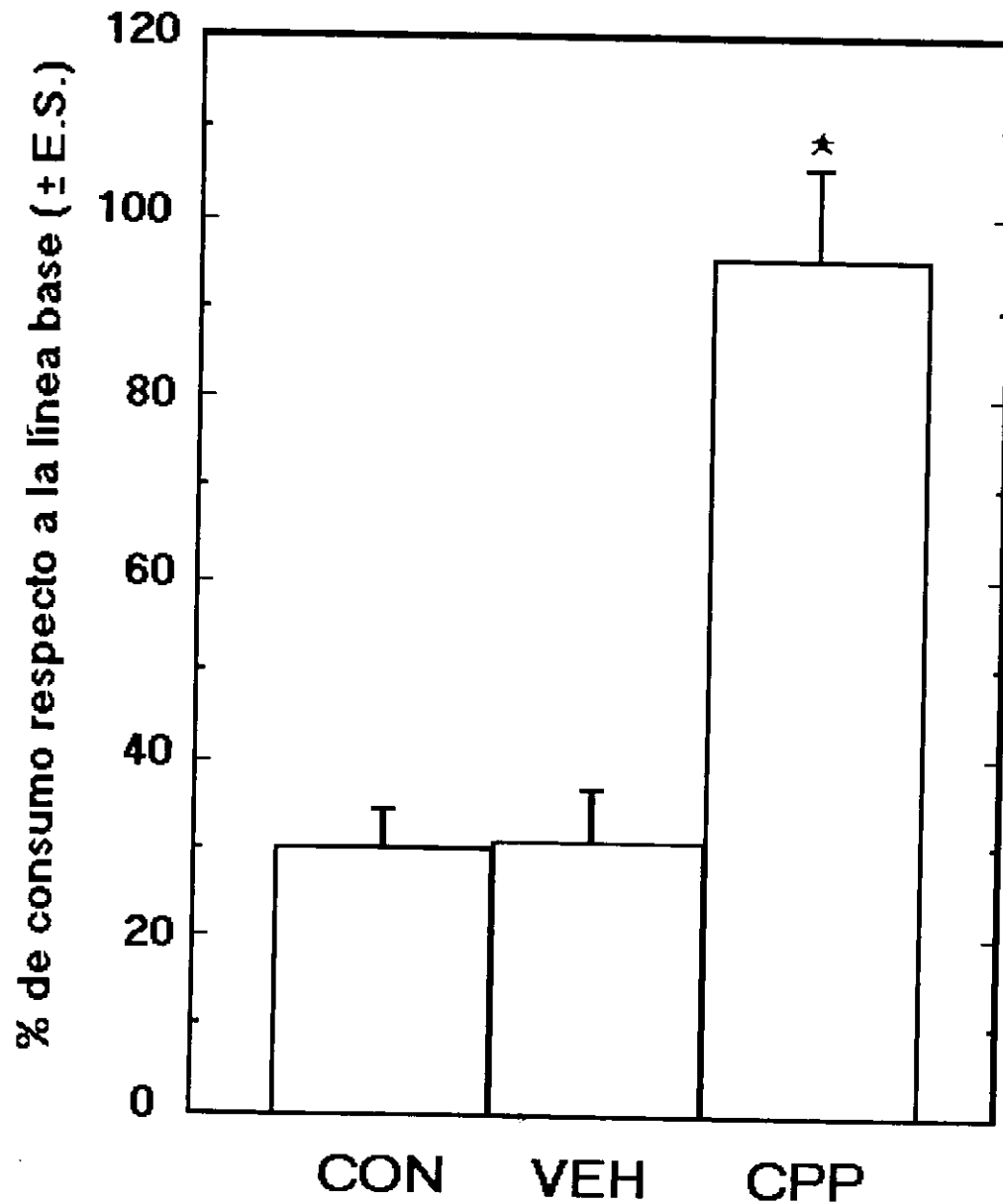
Por el contrario, se observaron diferencias significativas entre los grupos durante la retención de la prueba. El porcentaje de consumo de la solución de sacarina fue significativamente mayor en el grupo CPP al compararlo con los controles (VEH y CON). El análisis post-hoc empleando la prueba de Fisher denota una disminución significativa en la adquisición de la aversión al sabor,  $F_{2,20} = 25.569$ ;  $p < 0.0001$ , representado por el elevado consumo de solución de sacarina por parte del grupo CPP en comparación con los otros grupos (Gráfica 2). Los grupos VEH y CON no registraron diferencias significativas entre sí.

### Consumo de solución de sacarina durante la sesión de adquisición



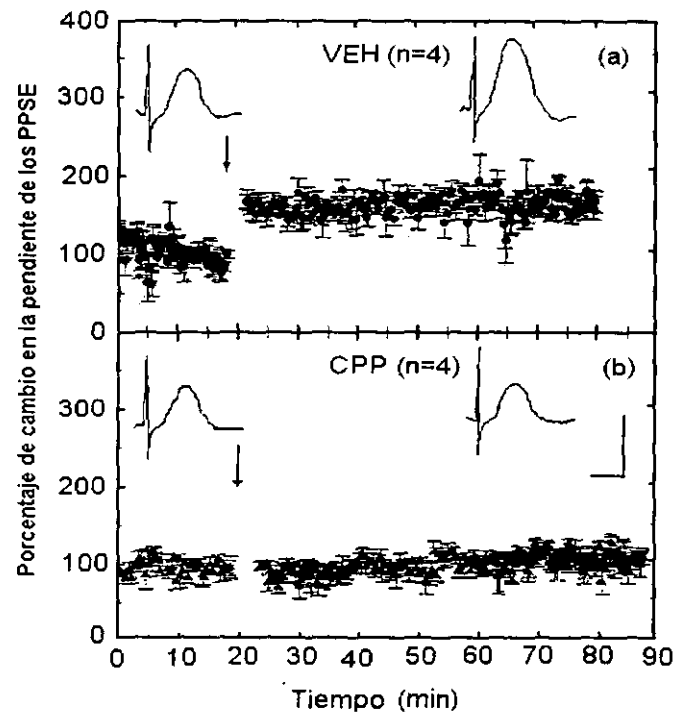
Gráfica 1. Consumo de la solución de sacarina durante la sesión de adquisición. Durante la primera presentación de la solución de sacarina con respecto a la línea base no se observaron diferencias significativas entre los porcentajes de consumo de los tres grupos. CON = grupo control intacto, VEH = grupo control vehículo PBS, CPP = grupo experimental tratado con CPP.

### Consumo de solución de sacarina durante la sesión de prueba



Gráfica 2. Efecto de la microinyección del CPP previa a la adquisición del CAS. Los animales recibieron una infusión intracortical del vehículo o del CPP 5  $\mu$ M una hora antes de la primera presentación de la solución de sacarina. Un grupo adicional permaneció intacto durante todo el procedimiento. En la gráfica se observa el consumo de la solución de sacarina 0.1 durante la sesión de prueba. CON = grupo control intacto, VEH = grupo control vehículo PBS, CPP = grupo experimental tratado con CPP. \* =  $p < 0.0001$ .

Estos datos son consistentes con los obtenidos para la LTP evocada en la CI (Gráfica 3). El grupo VEH mostró un incremento considerable en la respuesta sináptica ante estímulos de baja frecuencia inmediatamente después de la estimulación tetánica (aplicada en trenes de 100 Hz) y durante un periodo de por lo menos una hora después. La amplitud de los PPSE de campo de la CI varió de  $0.31 \pm 0.007$  mV (media  $\pm$  media del error estándar o e.s.) a  $0.48 \pm 0.005$  mV (media  $\pm$  e.s.), mientras que la pendiente promedio se incrementó desde un valor de  $0.081 \pm 0.003$  (media  $\pm$  e.s.) hasta  $0.127 \pm 0.002$  (media  $\pm$  e.s.).



Gráfica 3. Registros *in vivo* del efecto del antagonista a RNMDA, CPP (10mg/kg), en la LTP de la vía Bla-CI. En (a) se observa el registro de las respuestas evocadas en la CI del grupo VEH, el cuál recibió una administración i.p. de la solución vehiculo una hora previa al tren de alta frecuencia. La LTP fue observada inmediatamente después del estímulo tetanizante. En (b) se observa el registro de las respuestas evocadas en el grupo experimental CPP, en el cuál este fármaco fue administrado i.p. 60 minutos previos a la acción del estímulo tetanizante. En este caso, la LTP de la vía Bla-CI fue bloqueada por dicho fármaco. En la parte superior de cada gráfica se muestran ejemplos de las respuestas representativas de los PPSE de la CI inmediatamente antes y 60 minutos después de la inducción del estímulo tetanizante. El cambio porcentual de las pendientes de los PPSE para los grupos VEH y CPP después del estímulo tetanizante fue de  $158.81 \pm 0.85$  y  $95.78 \pm 0.78$  (media  $\pm$  e.s.) respectivamente. Barras de escala: 9 ms. 0.4 mV.



La LTP fue bloqueada por la aplicación del antagonista al R-NMDA, CPP al ser comparada con el grupo VEH. Los porcentajes de cambio de la pendiente de los PPSE de los grupos CPP y VEH fueron respectivamente de  $95.78 \pm 0.78$  (media  $\pm$  e.s.) y  $158.81 \pm 0.85$  (media  $\pm$  e.s.). El ANOVA para el incremento de las pendientes después del estímulo tetánico reveló diferencias significativas entre los grupos,  $F_{1,6} = 184.334$ ;  $p < 0.0001$ , corroborando así que la inducción de la LTP es dependiente de los receptores NMDA.

### **X b. Fase II**

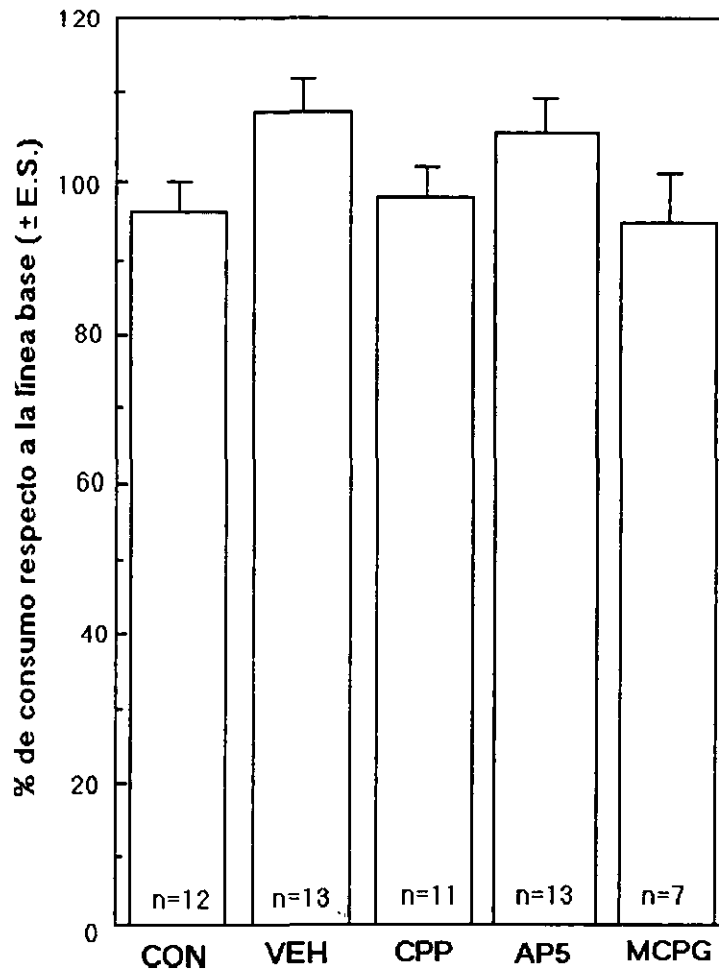
De modo similar a lo obtenido en la fase I, no se registraron diferencias significativas durante el consumo de la línea base ni de la solución de sacarina durante la adquisición del CAS entre los grupos. (Gráfica 4).

Durante la sesión de prueba se observa una diferencia significativa entre los grupos experimentales. En los grupos CPP y AP5 se observó un elevado consumo de la solución de sacarina en comparación con los grupos MCPG, VEH y CON. Los valores de consumo de la solución de sacarina entre los grupos CPP y AP5 fueron similares. El ANOVA aplicado a estos datos detectó diferencias significativas durante la prueba,  $F_{4,51} = 18.65$ ;  $p < 0.001$ . La prueba de Fisher demostró que los grupos CPP y AP5 presentan una deficiencia significativa en la adquisición de la aversión a los sabores como indicó el incremento en el consumo de la solución de sacarina en comparación con los grupos MCPG, VEH y CON ( $p < 0.001$ ). En contraste, el antagonista MCPG no provocó cambio alguno en la adquisición del CAS (Gráfica 5).

Los resultados obtenidos en el CAS son consistentes con los datos derivados de los experimentos electrofisiológicos de LTP evocada en la CI (Gráfica 6). El grupo VEH desplegó un incremento considerable en la respuesta sináptica ante estímulos de baja frecuencia inmediatamente después de la estimulación tetánica (aplicada en trenes de 100Hz) y durante un periodo de por lo menos una hora después. La amplitud de los

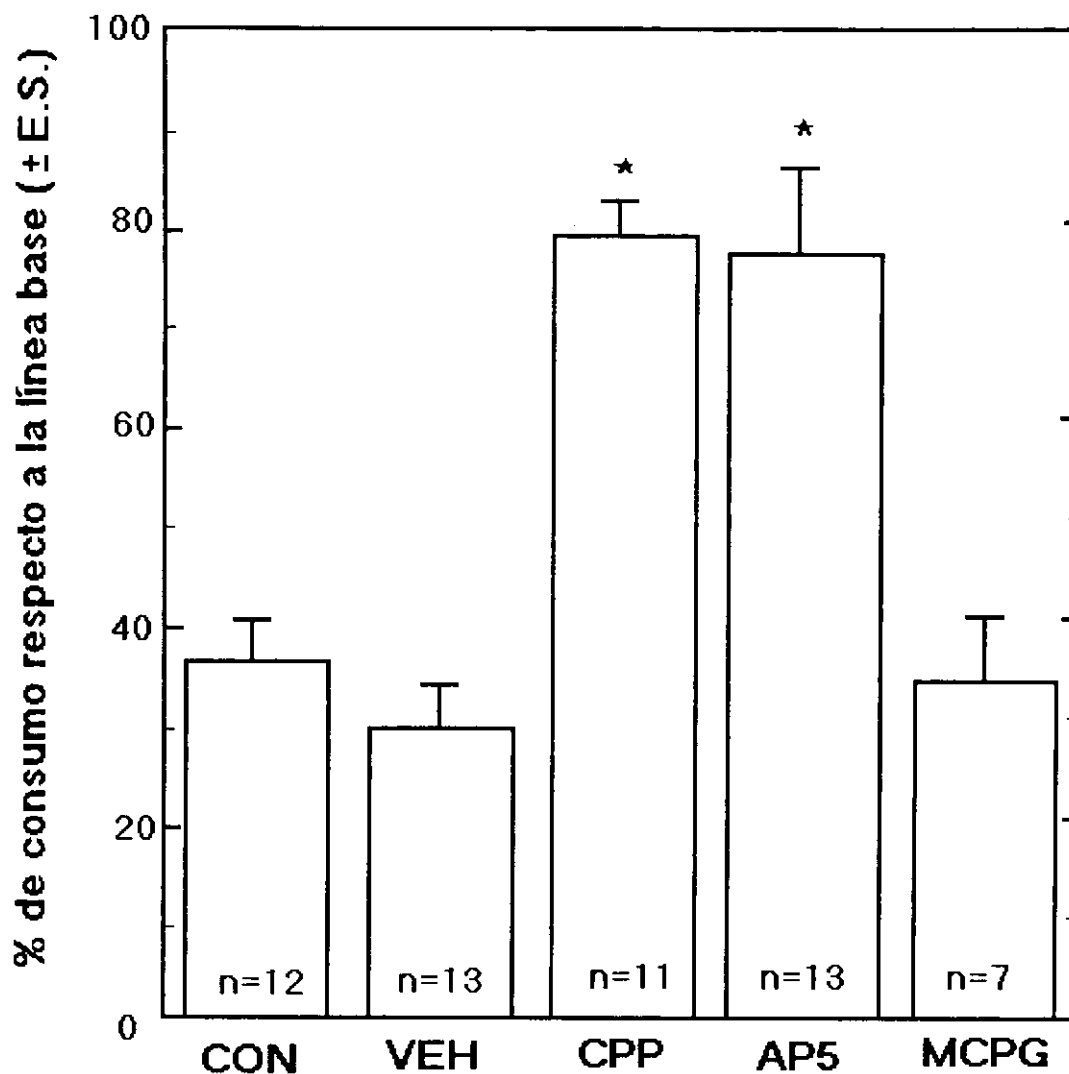
PPSE de la CI varió de  $0.30 \pm 0.008$  mV (media  $\pm$  e.s.) a  $0.49 \pm 0.007$  mV (media  $\pm$  e.s.), mientras que la pendiente promedio se incrementó desde un valor de  $0.09 \pm 0.004$  (media  $\pm$  e.s.) hasta  $0.149 \pm 0.004$  (media  $\pm$  e.s.).

#### Consumo de solución de sacarina durante la sesión de adquisición

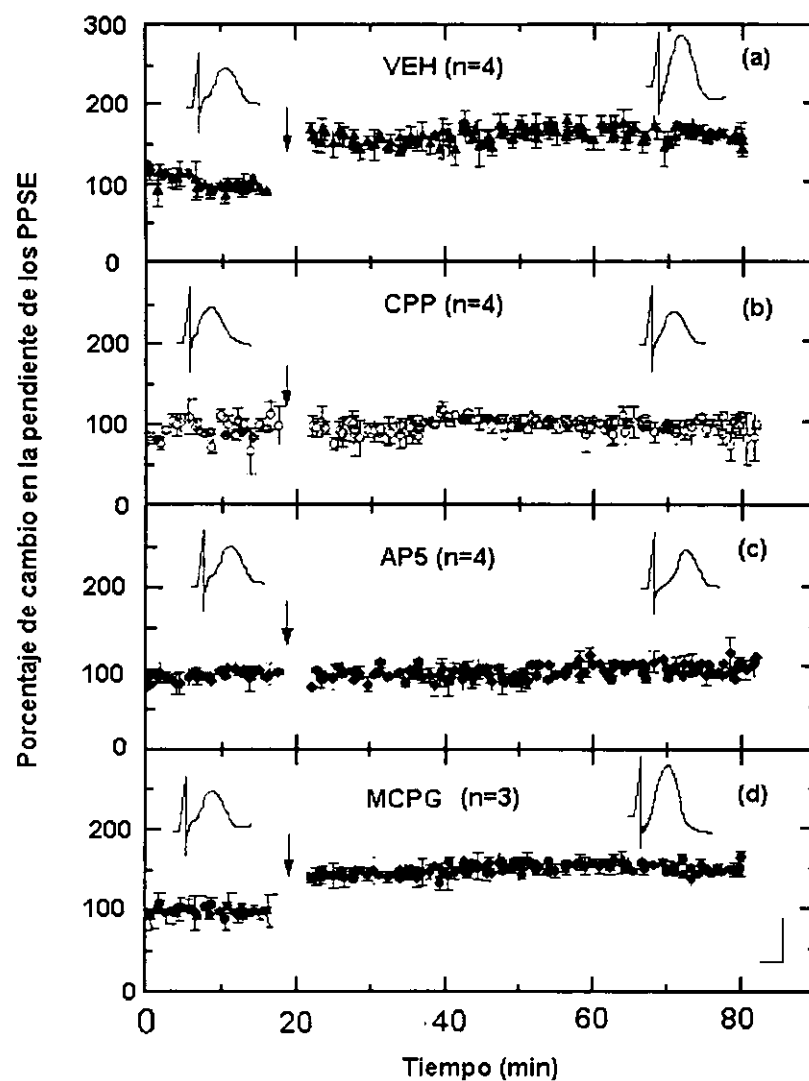


Gráfica 4. Consumo de la solución de sacarina durante la sesión de adquisición. No se observan diferencias significativas en los porcentajes de consumo de los diferentes grupos durante la primera presentación de la solución de sacarina con respecto a la línea base. CON = grupo control intacto, VEH = grupo control vehículo PBS, CPP = grupo experimental tratado con CPP, AP5 = grupo experimental tratado con AP5, MCPG = grupo experimental tratado con MCPG.

### Consumo de solución de sacarina durante la sesión de prueba



Gráfica 5. Efecto de la microinyección de los fármacos CPP, AP5 y MCPG administrados previamente a la adquisición del CAS sobre el consumo de solución de sacarina 0.1 % durante la sesión de prueba. Los animales recibieron un infusión intracortical del vehículo o de alguno de los tres fármacos 30 minutos antes de la primera presentación de la solución de sacarina. Un grupo permaneció intacto durante todo el procedimiento. CON = grupo control intacto, VEH = grupo control vehículo PBS, CPP = grupo experimental tratado con CPP (5  $\mu$ M), AP5 = grupo experimental tratado con AP5 (1.9 mM), MCPG = grupo experimental tratado con MCPG (1.8 mM)



Gráfica 6. Registros *in vivo* del efecto de los antagonistas CPP (5  $\mu$ M), AP5 (1.9mM) y MCPG (1.8mM) en la LTP de la vía Bla-CI. (a) Gráfica de las respuestas evocadas en los animales del grupo control que recibió una administración de la solución vehículo 30 minutos previos al tren de alta frecuencia. La LTP fue observada inmediatamente después del tren de alta frecuencia. En (b), (c) y (d) se observan las gráficas de las respuestas evocadas en la CI de los animales que recibieron una dosis de CPP, AP5 y MCPG respectivamente, 30 minutos previos al tren de alta frecuencia. La respuesta de la LTP de la vía Bla-CI fue bloqueada en (b) y en (c), no así en (d).

La LTP fue bloqueada por la aplicación de los antagonistas al R-NMDA, CPP y AP5, en comparación con el grupo VEH. EL MCPG no afectó la inducción de la LTP en la CI. El ANOVA para el incremento de las pendientes después del estímulo tetanizante reveló diferencias significativas entre los grupos,  $F_{3,11} = 118.86$ ; El análisis post-hoc con la prueba de Fisher demostró diferencias significativas entre los grupos CPP y AP5 en comparación con el grupo MCPG o el grupo VEH  $p < 0.0001$ , no así entre CPP y AP5. El cambio porcentual registrado en la pendiente de los PPSE grupos CPP, AP5, MCPG y VEH fue de  $96.98 \pm 0.88$  (media  $\pm$  e.s.),  $95.97 \pm 0.72$  (media  $\pm$  e.s.),  $155.42 \pm 1.03$  (media  $\pm$  e.s.) y  $165.79 \pm 1.71$  (media  $\pm$  e.s.), respectivamente.

## **XI. Discusión**

A principios del siglo XX Ramón y Cajal (1911) propuso que el sustrato físico de la memoria podría residir en las modificaciones más o menos perdurables en la fortaleza de la transmisión sináptica. Esta hipótesis ha sido retomada por prominentes neurobiólogos como Hebb y Marr, quienes formalizaron las bases teóricas que dirigen el estudio de los procesos celulares subyacentes al aprendizaje y la memoria.

La palabra plasticidad designa la capacidad de ser modelado. Al referirnos a la plasticidad sináptica estamos considerando la capacidad de las neuronas para establecer o modificar sus mecanismos de comunicación de modo más o menos permanente, teniendo como resultado un cambio en la eficiencia sináptica. Dichos cambios pueden expresarse de diversas formas, como en modificaciones de la eficiencia funcional en las sinapsis existentes, ya sea a través de la síntesis de nuevas proteínas (Nayak y col, 1998), o bien, en la expresión de formas alternativas de los receptores existentes (Sommer y col.). La inducción de

La LTP fue bloqueada por la aplicación de los antagonistas al R-NMDA, CPP y AP5, en comparación con el grupo VEH. EL MCPG no afectó la inducción de la LTP en la CI. El ANOVA para el incremento de las pendientes después del estímulo tetanizante reveló diferencias significativas entre los grupos,  $F_{3,11} = 118.86$ ; El análisis post-hoc con la prueba de Fisher demostró diferencias significativas entre los grupos CPP y AP5 en comparación con el grupo MCPG o el grupo VEH  $p < 0.0001$ , no así entre CPP y AP5. El cambio porcentual registrado en la pendiente de los PPSE grupos CPP, AP5, MCPG y VEH fue de  $96.98 \pm 0.88$  (media  $\pm$  e.s.),  $95.97 \pm 0.72$  (media  $\pm$  e.s.),  $155.42 \pm 1.03$  (media  $\pm$  e.s.) y  $165.79 \pm 1.71$  (media  $\pm$  e.s.), respectivamente.

## **XI. Discusión**

A principios del siglo XX Ramón y Cajal (1911) propuso que el sustrato físico de la memoria podría residir en las modificaciones más o menos perdurables en la fortaleza de la transmisión sináptica. Esta hipótesis ha sido retomada por prominentes neurobiólogos como Hebb y Marr, quienes formalizaron las bases teóricas que dirigen el estudio de los procesos celulares subyacentes al aprendizaje y la memoria.

La palabra plasticidad designa la capacidad de ser modelado. Al referirnos a la plasticidad sináptica estamos considerando la capacidad de las neuronas para establecer o modificar sus mecanismos de comunicación de modo más o menos permanente, teniendo como resultado un cambio en la eficiencia sináptica. Dichos cambios pueden expresarse de diversas formas, como en modificaciones de la eficiencia funcional en las sinapsis existentes, ya sea a través de la síntesis de nuevas proteínas (Nayak y col, 1998), o bien, en la expresión de formas alternativas de los receptores existentes (Sommer y col.). La inducción de

la LTP conlleva a la modificación de los procesos de comunicación neuronal a través de mecanismos de este tipo y ulteriormente, en algunos casos, en la formación de nuevas sinapsis (Ben-Ari y Represa, 1990),

La LTP es un modelo de plasticidad sináptica profusamente estudiado inicialmente en la formación hipocampal y que más tarde se ha inducido en diversas áreas de la neocorteza (Tsumoto, 1992; Bear y Kirkwood, 1993). Dadas sus características de asociatividad, cooperatividad, especificidad y larga duración, la LTP ha sido reconocida como un modelo capaz de explicar los procesos celulares que permiten la formación de ciertos tipos de memoria. Los mecanismos que inducen la LTP tanto en la región hipocampal como en las diversas áreas de la neocorteza cerebral se encuentran ampliamente documentados. Se ha observado que los R-NMDA son particularmente importantes para la inducción de la LTP, por ser los principales responsables del incremento de los niveles de  $Ca^{+2}$  en la post-sinapsis (Roberson y col, 1996; Malenka, 1989) y por ende, de la cascada de eventos metabólicos subsecuentes (activación de proteínas cinasas, activación del metabolismo del fosfatidil inositol, etc.) responsables del establecimiento y mantenimiento de la LTP durante un periodo de tiempo prolongado. Existe evidencia que sugiere una fuerte correspondencia entre los mecanismos celulares involucrados en la LTP con aquellos que permiten la adquisición de ciertos tipos de aprendizaje.

A lo largo del presente estudio, se ha mencionado que la integridad de la CI está estrechamente vinculada con los procesos cognitivos involucrados en el CAS (Bermúdez-Rattoni y col, 1995). Los resultados obtenidos en la fase I de nuestro trabajo demostraron que la administración intracortical del antagonista al R-NMDA, CPP, previa al entrenamiento del CAS trastorna su adquisición. El consumo del estímulo gustativo registrado en el grupo CPP sugiere una importante participación de los R-NMDA en la adquisición del CAS. Estos resultados son consistentes con los datos obtenidos por Rosenblum y colaboradores

(1997), quienes reportan que el bloqueo de los R-NMDA de la CI durante el entrenamiento del CAS bloquea su adquisición, mientras que el bloqueo de los R-NMDA en una corteza adyacente no produce ningún efecto en la adquisición del mismo. Recientemente, Gutiérrez y colaboradores (1999) reportaron que la administración intracortical del antagonista a los R-NMDA, AP5, en la CI durante la presentación del estímulo novedoso en el CAS, bloquea la adquisición esta conducta.

Al comparar los resultados de la prueba conductual con aquellos derivados de la inducción de la LTP de la vía Bla-CI en la fase I, se observa que los efectos obtenidos son similares. Así la administración intraperitoneal de CPP una hora previa a la aplicación del estímulo tetanizante bloqueó la inducción de la LTP en la CI. De manera similar, el mismo fármaco administrado directamente a la CI una hora antes de la presentación del estímulo gustativo novedoso durante la sesión de adquisición del CAS obstruye la adquisición de la conducta de aversión al sabor. Esto sugiere que tanto la inducción de la LTP de la vía Bla-CI como la adquisición del CAS son dependientes de la integridad funcional de los R-NMDA. En la actualidad, la dependencia de la LTP hacia los R-NMDA en ciertas áreas del hipocampo y de la neocorteza está bien establecida. La administración de antagonistas a los R-NMDA tales como el AP5, el CPP y el MK-801 bloquea la inducción de la LTP, por tanto, es posible establecer un correlato entre el modelo conductual y el modelo electrofisiológico en el cuál la adquisición del primero y la inducción del segundo comparten la dependencia a la activación de los R-NMDA.

En la fase II de nuestro estudio, esta correlación fue nuevamente evaluada bajo un estrecho marco de correspondencia entre las concentraciones de los fármacos empleados. Resulta importante señalar que durante la fase I, la administración del CPP en la etapa conductual se efectuó directamente en el tejido cortical, mientras que la administración para la inducción de la LTP se efectuó por vía intraperitoneal. En la segunda fase del presente estudio la administración de los fármacos



empleados fue intracortical tanto para la inducción de la LTP como para la adquisición del CAS, con el objeto de establecer un correlato más fiel entre ambos procesos. Fue así que se igualaron las concentraciones administradas a los animales para reducir los posibles efectos colaterales que pudiesen presentarse en el caso de que los fármacos interactuaran con estructuras ajenas a la vía involucrada en nuestro estudio y que pudiese limitar alguna capacidad relevante durante la ejecución del CAS y, evidentemente, se lograron homogenizar las variables metodológicas comunes a las etapas conductual y electrofisiológica.

De este modo, durante la segunda fase del trabajo experimental, se amplió el estudio del efecto de los antagonistas a los R-NMDA, utilizando AP5 además del CPP. El CAS resultó nuevamente afectado ante la administración de ambos antagonistas. La administración de estos fármacos previa a la presentación del estímulo novedoso afecta severamente la adquisición del CAS, dando como resultado una ejecución deficiente durante la sesión de prueba. Estos resultados sugieren nuevamente la fuerte dependencia que presenta la adquisición del CAS hacia los R-NMDA. En esta fase, el marco temporal empleado nos ofreció resultados altamente congruentes con nuestra primera fase y con otros trabajos que destacan la importancia de los R-NMDA para la adquisición de diferentes pruebas conductuales. En el hipocampo, el bloqueo de los R-NMDA por medio de antagonistas como el AP5 o el CPP afecta la ejecución de pruebas conductuales como el laberinto de agua (Morris, 1989 y Reikkinen y Reikkinen Jr., 1997), mientras que el MK-801 presenta un efecto similar en el laberinto radial (Ward y col, 1990).

Paralelamente, la inducción de la LTP de la vía Bla-CI es bloqueada nuevamente por el CPP y ahora también por el AP5. Para ambos antagonistas obtuvimos un efecto comparable con el producido durante la prueba conductual.

Un aspecto importante de esta fase experimental resulta de examinar la participación de los mGluR I en el CAS y la LTP de la vía Bla-

CI. Nuestros resultados demuestran que la administración intracortical del MCPG en la CI no afecta la adquisición del CAS, lo cual sugiere que los mGluR I no participan en esta etapa del proceso del aprendizaje. Frohardt y colaboradores (1999) reportan que el MCPG a concentraciones similares a las utilizadas en nuestro estudio, tampoco produce efecto alguno en la ejecución de pruebas de condicionamiento al miedo.

Correspondientemente, la administración intracortical del MCPG en la CI no afecta la inducción de la LTP de la CI, lo cual sugiere que los mGluR I no participan durante la inducción de ésta. Dentro del estudio de los mGluR, existe una fuerte discrepancia en cuanto a la participación que este grupo de receptores glutamatérgicos pudiese tener durante la inducción de la LTP. Como se ha mencionado, existen trabajos que reportan el que la administración del MCPG es capaz de bloquear la inducción de la LTP en rebanadas de hipocampo de rata a concentraciones similares a las utilizadas en el presente estudio (Bashir y col, 1993). Riedel y colaboradores (1995) encontraron resultados similares trabajando en el giro dentado de ratas en libre movimiento, y Vickery y colaboradores (1997) en rebanadas de corteza frontal media en cerebro de ratas. Otros grupos, por el contrario, no han logrado reproducir este hecho. Chinestra y colaboradores (1993) estudiaron el efecto del MCPG en neuronas hipocámpales de CA1 a través de registros intra y extracelulares sin lograr bloquear la inducción de la LTP. En los trabajos de Manzoni y colaboradores (1994) el MCPG no tuvo efecto en la LTP hipocámpal de las áreas CA1 y CA3. Huber y colaboradores (1998) realizaron sus experimentos en corteza visual y demostraron que el MCPG no tiene efecto alguno en la inducción de ninguna forma de plasticidad como LTP, LTD y depotenciación en esta área. Nuestros datos apoyan esta serie de estudios. Al considerar la escasez de trabajos que plantean la participación de los receptores metabotrópicos en la LTP neocortical, el presente estudio reviste gran interés puesto que analiza la participación de los mGluR I en la vía Bla-CI. Nuestros experimentos muestran que la administración

intracortical del antagonista MCPG no alteró significativamente la adquisición del CAS ni bloqueó la inducción de la LTP en la CI. Estos resultados sugieren que los mGluR-I no participan durante la adquisición del CAS ni en la inducción de la LTP de la vía Bla-CI. Alternativamente se ha planteado la posibilidad de que la actividad de los receptores metabotrópicos a glutamato pueda modificar el umbral de inducción de la LTP (McCaffery y col, 1999).

Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que la administración de los antagonistas a R-NMDA, AP5 y CPP previa al entrenamiento afecta la adquisición del CAS. De modo similar, estos antagonistas bloquearon la inducción de la LTP de la CI destacando la participación de los R-NMDA en ambos procesos. La participación de los R-NMDA durante el aprendizaje y frecuentemente en la inducción de la LTP hipocampal y neocortical es un hecho constantemente comprobado. A este respecto, Tang y colaboradores (1999) aportaron nueva evidencia al crear una cepa de ratones transgénicos en los que la subunidad 2B de los R-NMDA (NR2B) fue sobreexpresada. El efecto obtenido en esta cepa fue una mayor facilidad en la inducción y duración de la LTP de la vía de las colaterales de Shaffer al área CA1 hipocampal, así como un mejor desempeño en pruebas conductuales de diversa índole, como el laberinto de agua para evaluar la memoria espacial, la prueba de reconocimiento de objeto nuevo para evaluar memoria visual, y el condicionamiento contextual al miedo para evaluar la memoria emocional. Con este estudio, Tang y colaboradores demostraron que los R-NMDA funcionan como moduladores de los procesos moleculares implicados en la plasticidad sináptica de la formación de la memoria.

Finalmente, los resultados experimentales obtenidos en nuestro estudio abarcan dos aspectos de importancia a considerar, por una parte las modificaciones obtenidas en un paradigma de aprendizaje, en este caso el CAS, y por otra, el análisis resultante de la comparación con los datos provenientes de los registros de la LTP evocada en la CI. Morris (1989)

planteaba ya la necesidad de combinar la experimentación fisiológica y la conductual, por tanto, la caracterización de un modelo electrofisiológico del proceso mnémico permite recabar e interpretar con mayor precisión los datos que los procesos reales nos aportan (para una revisión consultar Martín y col, 2000).

Tanto Morris (1989) como Davis (1992) destacan como un logro importante de sus trabajos haber obtenido un efecto comparable entre la prueba conductual y la LTP ante las mismas concentraciones del antagonista utilizado. Para Morris esto sugirió, primero, que la LTP podría estar involucrada en ciertos tipos de aprendizaje y segundo, que estaba involucrada en la fase asociativa inicial del aprendizaje pero no en el recuerdo. En nuestro estudio resulta también de singular importancia el haber obtenido efectos similares en los experimentos conductuales y electrofisiológicos, mostrando que las concentraciones de CPP y AP5 necesarias para bloquear la inducción de la LTP de la CI fueron capaces de afectar la ejecución del CAS.

Tal como planteamos anteriormente, se considera que los mecanismos involucrados en la LTP son análogos a los que subyacen a los procesos mnémicos. Ejemplo de esto lo observamos en el trabajo de Escobar y Bermúdez-Rattoni (2000), en el cual la inducción de la LTP de la vía Bla-CI una semana previa al entrenamiento del CAS incrementa la retención de la prueba. Asimismo, Iriki y colaboradores (1991) sugieren que la LTP en la corteza motora forma parte importante durante la formación del aprendizaje motor. Por su parte, los trabajos de Chen y colaboradores (1996) sugieren que la LTP podría ser un mecanismo importante para la memoria visual y durante la formación de los patrones de reconocimiento en la corteza temporal humana.

En resumen, el presente estudio demostró que los antagonistas de los R-NMDA bloquean la adquisición del CAS, un paradigma de aprendizaje que depende de la integridad de la CI, cuando estos son administrados intracorticalmente. De modo similar, estos fármacos afectan

la inducción de la LTP de la vía Bla-CI *in vivo*. La administración intracortical del antagonista de RmGlu-I, MCPG, no produjo alteraciones en la inducción de la LTP de la CI ni en la adquisición del CAS. Tales resultados aportan información de interés con respecto a la posible correspondencia que existe entre los mecanismos que soportan la LTP neocortical dependiente de R-NMDA y su participación como un posible mecanismo para las funciones cognitivas desempeñadas por la CI.

Reiteradamente se ha abordado la relevancia que para las neurociencias reviste el estudio de los fenómenos de plasticidad sináptica. El conocimiento recabado a través del tiempo nos brinda la información necesaria acerca de la fisiología neuronal como para comprender que los mecanismos que subyacen a las modificaciones conductuales de los seres vivos, se deben necesariamente a las modificaciones en la comunicación neuronal del sistema nervioso central. Los estudios de dichas modificaciones nos proveen de valiosa información para lograr comprender como procesamos la información que recibimos y el cómo respondemos a ella. El estudio de la LTP como el modelo de plasticidad sináptica mejor caracterizado se ha convertido en una poderosa herramienta en el estudio de diversos aspectos de la conducta, en particular del aprendizaje y la memoria.

A lo largo de las dos últimas décadas se han desarrollado numerosos estudios que intentan establecer los mecanismos celulares o moleculares comunes entre la LTP y el aprendizaje y la memoria. Pocos son aún los trabajos que han pretendido estudiar esta relación en las vías neocorticales, a pesar de que la corteza es considerada como un área fundamental para la memoria declarativa. De aquí lo interesante que resulta encontrar una correspondencia congruente entre la LTP de la CI y su contraparte en el CAS.

Los resultados obtenidos en nuestros estudios dejan ver las ventajas que posee el CAS para un estudio más detallado de la participación de los distintos elementos celulares que requieren en común la LTP y el CAS. Es

sumamente importante aprovechar la excelente caracterización que al respecto se tiene de las vías anatómicas involucradas en el CAS.

A futuro se propone un estudio más detallado que permita disectar la participación de los mGluR durante las etapas posteriores a la inducción de la LTP de la CI y la adquisición del CAS. En la actualidad, se conoce la serie de eventos metabólicos que sustentan la inducción de la LTP y en menor medida los que permiten su mantenimiento. Se reconoce ampliamente la participación de las proteínas de tipo cinasa en este proceso (Malenka y col, 1989) y la dependencia de éstas al  $Ca^{+2}$ . Los mGluR-I promueven la formación del inositol 1,4,5 trifosfato y el diacilglicerol, los cuales actúan como segundos mensajeros, el primero activando la movilización intracelular del calcio y el segundo estimulando la fosforilación de proteínas (Ferraguti y col, 1994). La activación de la proteína cinasa dependiente de calcio-calmodulina promueve la producción del cAMP, y este a su vez la activación de la PKA, dando lugar a la fosforilación de una proteína reguladora conocida como "cAMP response element binding protein" (CREB). CREB es un factor de transcripción que al unirse al "cAMP response element" (CRE) promueve la transcripción del gene asociado, incrementando así la síntesis de nuevas proteínas (Abel y col, 1997). Establecer por tanto la función que pudiesen desempeñar los mGluR así como la participación de otros neurotransmisores como moduladores en el establecimiento de la LTP resultaría de gran utilidad en la comprensión de los eventos que permiten la consolidación de la memoria a largo plazo.

## **XII. Referencias**

- Abel, T., P.V. Nguyen, M. Barad, T.A. Deuel, E.R. Kandel y R. Bourtchouladze (1997). "Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and Hippocampus-based long-term memory. **Cell**, 88(5): 615-626.
- Abeliovich, A., R. Paylor, C. Chen, J.J. Kim, J.M. Wehner, S. Tonegawa (1993). "PKC gamma mutant mice exhibit mild deficits in spatial and contextual learning". **Cell** 75 (7): 1263-71
- Abeliovich, A., C. Chan, Y. Goda, A.J. Silva, C.F. Stevens y S. Tonegawa (1993). "Modified hippocampal long-term potentiation in PKC gamma mutant mice". **Cell** 75 (7): 1253-1262
- Abraham, W.C. y A. Huggett (1997). "Induction and reversal of long-term potentiation by repeated high-frequency stimulation in rat hippocampal slices". **Hippocampus**, 7(2):137-45.
- Artola, A. y W. Singer (1990). "The involvement of N-methyl-D-aspartate receptors in induction and maintenance of long term potentiation in rat visual cortex." **Eur. J. Neurosci.** 2: 254-269
- Barnes C.A., M.W. Jung, B.L. Mc Naughton, D.L. Korol, K. Andreasson, P.F. Worley (1994). "LTP saturation and spatial learning disruption: effects of task variables and saturation levels". **J. Neurosci.** 14 (10): 5793-5806
- Barnes, J.M. y J.M. Henley (1992). "Molecular characteristics of excitatory amino acid receptors". **Prog Neurobiol** 39 (2): 113-33
- Barria, A., V. Derkach y T. Soderling (1997) "Identification of the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase I phosphorylation site in the alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate-type glutamate receptor. " **J. Biol. Chem.** 272(52):32727-30
- Bashir, Z.I., Z.A. Bartolotto, C.H. Davies, N. Berretta, A.J. Irving, A.J. Seal, J.M. Henley, D.E. Jane, J.C. Watkins y G.L. Collingridge (1993). "Induction of LTP in the hippocampus needs synaptic activation of glutamate metabotropic receptors." **Nature Lond.** 363: 347-350
- Bear y Kirkwood (1993). "Neocortical long-term potentiation". **Curr. Opin. Neurobiol.** 3: 197-202

- Ben-Ari, Y., L. Aniksztejn y P. Bregestouski (1992). "Protein kinase C modulation of NMDA currents. An important link for LTP induction". **Trends Neurosci.**, 15:333-341.
- Ben-Ari, Y., R. Khazipov, X. Leinekugel, O. Caillard y J.L. Gaiarsa (1997). "GABAA, NMDA and AMPA receptors: a developmentally regulated 'menage a trois'." **Trends Neurosci.** 20(11):523-9
- Ben-Ari, Y. y A. Represa (1990). "Brief seizure episodes induce long-term potentiation and mossy fibre sprouting in the hippocampus". **Trends Neurosci.**, 13 (8): 312-318.
- Benke, T.A., A. Luthi, J.T. Isaac y G.L. Collingridge (1998). "Modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity." **Nature** 393(6687):793-7
- Bermúdez-Rattoni, F, I.B. Introini-Collison, K. Coleman-Mesches y J.L. McGaugh (1997). "Insular Cortex and Amigdala lesions induced after aversive training impair retention: effects of degree of training." **Neurobiol. Learn. and Memory.** 67: 57-63
- Bermúdez-Rattoni, F., I.B. Introini-Collison y J.L. McGaugh (1991). "Reversible inactivation of the insular cortex by tetrodotoxin produces retrograde and anterograde amnesia for inhibitory avoidance and spatial learning". **Proc. Natl. Acad. Sci.** 88:5379-5382
- Bermúdez-Rattoni, F., J.L. McGaugh (1991). "Insular cortex and amygdala lesions defferentially affect acquisition of inhibitory avoidance and conditioned taste aversion". **Brain Res.**, 549:165-170
- Bermúdez-Rattoni, F., C.E. Ormsby, M.L. Escobar y E. Hernández-Echeagaray (1995). "The role of insular cortex inthe acquisition and long lasting memory for aversively motivated behaviors." En: J.L. McGaugh, F. Bermúdez-Rattoni y R.A. Prado-Alcalá (Eds), **Plasticity in the central Nervous System: Learning and Memory**, Lawrence Erlbaum Associates, Hillside, N.J.
- Bermúdez-Rattoni, F. Y T. Yamamoto (1998). "Neuroanatomy of CTA: lesions studies" en Bures, J., F. Bermúdez-Rattoni y T. Yamamoto (1998). **Conditioned Taste Adversion.** Oxford Science Publication, USA.
- Bernstein, I. (1991). "Flavor Aversion" en T.V. Getchell, R.L. Doty, L.M. Bartoshuk y J.B. Snow, Jr. (Eds.) **Smell and Taste in Health and Disease.** Raven Press: USA.



- Bettler, B. y C. Mulle (1995). "Review: neurotransmitter receptors. II. AMPA and kainate receptors." **Neuropharmacology** 34(2):123-39
- Blake, J.F., M.W. Brown y G.L. Collingridge (1988). "CNQX blocks acidic amino acid induced depolarizations and synaptic components mediated by non-NMDA receptors in rat hippocampal slices." **Neurosci. Lett.** 89(2):182-6
- Bliss, T.V. y Collingridge, G.L. (1993). "A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus", **Nature**, 361:31-39.
- Bliss, T.V. y T.V.P. Lømo (1973). "Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path", **J. Physiol.**, 232:331-356.
- Bounomano, D.V. y M.M. Merzenich (1998). "Cortical plasticity". **Ann. Rev. Neurosci.** 21: 149-186.
- Braun, J.J., P.S. Lasiter y S.W. Kiefer (1982). "The gustatory neocortex of the rat". **Physiological Psychology**, 10: 13-45.
- Brodal, P. (1992). "**The Central Nervous System. Structure and function**". Oxf. Univ. Press., USA.
- Brown, J.J., P.S. Lasiter y S.W. Kiefer (1982). "The gustatory neocortex of the rat". **Physiol. Psychol.** 10:13-45
- Bures, J. (1998). "Ethology, physiological psychology, and neurobiology of CTA" en Bures, J., F. Bermúdez-Rattoni y T. Yamamoto (1998). **Conditioned Taste Adversion**. Oxford Science Publication, USA.
- Castro, C.A., L.H. Silbert, B.L. McNaughton y C.A. Barnes (1989). "Recovery of learning following decay of experimental saturation of LTE at perforant path synapses". **Nature** 342: 545-548.
- Chen, W.R., S. Lee, K. Sato, D.D. Spencer, G.M. Sheperd y A. Williamson (1996). "Long-term modifications of synaptic efficacy in the human inferior and middle temporal cortex". **Proc. Natl. Acad Sci.** 93: 8011-80.25
- Chinestra, P., L. Aniksztejn, D. Diabira y Y. Ben-Ari (1993). "(RS)- $\alpha$ -methyl-4-carboxyphenylglycine neither prevents induction of LTP nor antagonizes metabotropic glutamate receptors in CA1 hippocampal neurons." **J. Neurophysiol.** 70, 2684-2689.
- Colino, A. y R.C. Malenka (1993). "Mechanisms underlying induction of long-term potentiation in rat medial and lateral perforant paths in vitro." **J. Neurophysiol.** 69(4):1150-9

- Collingridge G.L. y T.V.P. Bliss (1987). "NMDA receptors -their role in long-term potentiation". **Trends Neurosci.** 10:288-293.
- Collingridge G.L., S.J. Kehl y H. McLennan (1983). "Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Shaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus". **J. Physiol.** 334: 33-46
- Cotman, C.W., D.T. Monaghan y A.H. Ganong (1988). "Exitatory Amino Acid Neurotransmission: NMDA Receptors and Hebb-Type Synaptic Plasticity". **Ann. Rev. Neurosci.** 11: 61-80.
- Davis, M. (1994), "The role of the amygdala in emotional learning". **Int. Rev. Neurobiol.**
- Davis, S., T.V. Bliss, G. Dutriex, S. Laroche y M.L. Errington (1997). "Induction and duration of long term potentiation in the hippocampus of the freely moving mouse." **J. Neurosci. Methods** 75:75-80.
- Davis, S., S.P. Butcher y R.G. Morris (1992). "The NMDA receptor antagonist D-2-amino-5-phosphonopentanoate (D-AP5) impairs spatial learning and LTP *in vivo* at intracerebral concentrations comparable to those that block LTP *in vitro*". **J. Neurosci.** 12: 21-34.
- Daw, N.W., P.S.G. Stein y K.Fox (1993). "The role of NMDA receptors in information processing". **Ann Rev. Neurosci.** 16: 207-222
- Debanne, B.H. Gahwiler y S.M. Thompson (1996). "Cooperative interactions in the induction of long-term potentiation and depression of synaptic excitation between hippocampal CA3-CA1 cell pairs *in vitro*". **Proc Natl Acad Sci U S A.** 93(20):11225-30.
- Derrick, B.E., S.B. Weinberger y J.L. Jr. Martínez (1991). "Opioid receptors are involved in an NMDA receptor-independent mechanism of LTP induction at hippocampal Mossy Fiber-CA3 Synapses". **Brain Res. Bull.**, 27:219-233.
- Dudai, Y. (1989). **The Neurobiology of Memory, Concepts, Findings, Trends.** Oxf. Univ. Press. U.K.
- Dunn, L. y Everitt, B. (1988). "Double dissociations of the effects of amygdala and insular cortex lesions on conditioned taste aversion, passive avoidance, and neophobia in the rat using the excitotoxin ibotenic acid". **Behav. Neurosci.**, 102(1):3-23.

- Duvoisin, R.M., C. Zhang y K. Ranonell (1995). "A novel metabotropic glutamate receptor expressed in the retina and olfactory bulb" **J. Neurosci** 15(4): 3075-83
- Eichenbaum (1997). "To cortex: thanks for the memories". **Neuron** 19: 481-484.
- Escobar, M.L. y F. Bermúdez-Rattoni (2000). "Long-term potentiation in the insular cortex enhances conditioned taste aversión retention". **Brain Res.** 852: 208-212.
- Escobar, M.L., V. Chao y F. Bermúdez-Rattoni (1998). "In vivo long-term potentiation in the insular cortex: NMDA receptor dependence". **Brain Res.** 779: 314-319.
- Escobar, M.L., J. Fernández, R. Guevara-Aguilar y F. Bermúdez-Rattoni (1989). "Fetal brain grafts induce recovery of learning deficits and connectivity in rats with gustatory neocortex lesion". **Brain Res.** 478: 368-374
- Falls, W.A., M.J. Miserendino, M. Davis (1992). "Extinction of fear-potentiated startle: blockade by infusion of an NMDA antagonist into the amygdala." **J. Neurosci.** 12(3):854-63
- Fernández-Espejo (1996). "Neurobiología básica de la formación hipocámpica", **Rev. Neurol.**, 24(131):779-784.
- Ferraguti, F., P. Cavanni, H. Eistetter, C. Salvagno, E. Ratti y D.G. Trist (1994). "Competitive antagonism by phenylglycine derivatives at type I metabotropic glutamate receptors". **Mol Cell Neurosci.** 5(3):269-76.
- Finger, S. (1994). **Origins of Neuroscience. A history of Explorations into Brain Function.** Oxf. Univ. Press. USA.
- Fotuhi, M., D.G. Standaert, C.M. Testa, J.B. Penney Jr. y A.B. Young (1994). "Differential expression of metabotropic glutamate receptors in the hippocampus and entorhinal cortex of the rat". **Brain Res Mol Brain Res.** 21(3-4):283-92.
- Frohardt, R.J., F.A. Guarraci y S.T. Young (1999). "Intrahippocampal infusions of a metabotropic glutamate receptor antagonist block the memory of context-specific but not tene-specific conditioned fear". **Behav. Neurosci.** 113:222-227.
- Gaffan, D. y E.A. Murray (1992). "Monkeys (*Macaca fascicularis*) with rhinal cortex ablations succeed in object discrimination learning despite 24-hr

- intertrial intervals and fail at matching to sample despite double sample presentations." **Behav. Neurosci.** 106(1):30-8
- García, J. Y Koelling (1966) "Relation of cue to consequence in avoiding learning". **Psychonomic Science**, 4:123-124
- Green, E.J. y W.T. Greenough (1986). "Altered synaptic transmission in dentate gyrus of rats reared in complex environments: evidence from hippocampal slices maintained in vitro". **J. Neurophysiol.** 55(4): 739-750
- Gutiérrez, H., E. Hernández-Echegaray, V. Ramírez Amaya y F. Bermúdez-Rattoni (1999). "Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors in the insular cortex disrupts taste aversion and spatial memory formation". **Neuroscience** 89 (3):751-758.
- Hebb, D.O. (1949). **The organization of behavior.** Wiley USA.
- Hernández, R.V., B.E. Derrick, W.A. Rodriguez y J.L. Jr. Martinez (1994). "(+/-) CPP, an NMDA receptor antagonist, blocks the induction of commissural-CA3 LTP in the anesthetized rat." **Brain. Res.** 656(1):215-9
- Herrling, P.L. (1985) "Pharmacology of the corticocaudate excitatory post-synaptic potential in the cat: evidence for its mediation by quis- or kainate-receptors". **Neuroscience** 14: 417-426.
- Herron, C.E., R. Williamson y G.L. Collingridge (1985). "A selective N-methyl-D-aspartate antagonist depresses epileptiform activity in rat hippocampal slices". **Neurosci. Lett.** 61: 255-260.
- Hirsch, J.C. y F. Crepel (1990). "Use-dependent changes in synaptic efficacy in rat prefrontal neurons *in vitro*." **J. Physiol.** 427: 31-49
- Hrabetova, S. y T.C. Sacktor (1997). Long-term potentiation and long-term depression are induced through pharmacologically distinct NMDA receptors. **Neurosci. Lett.** 25: 107-110.
- Huettner, J.E. (1997). "Functional properties of kainate receptors" en Monaghan, D.T. y C.W. Cotman (Eds.) **The Ionotropic Glutamate Receptors, Humana Press Inc, USA**
- Hume, R.I., R. Dingledine y S.F. Heinemann (1991). "Identification of a site in glutamate receptor subunits that controls calcium permeability. **Science** 253:1028-1031.
- Iriki, A., C. Paulides, A. Keller y H. Asanuma (1991). "Long-term potentiation in the motor cortex". **Science** 245: 1385-1387.

- Izquierdo, I. (1994). "Pharmacological evidence for a role of long-term potentiation in memory". **FASEB J.** 8:1139-1145.
- Izquierdo, I. y J. H. Medina (1995). "Correlación between the pharmacology of Long-Term Potentiation and the farmacology of memory". **Neurobiol-Learn-Mem.**, jun; 63 (1): 19-32.
- Izumi, Y, y C.F. Zorumski (1994). "Developmental changes in the effects of metabotropic glutamate receptor antagonist in CA1 long-term potentiation inrat hippocampal slices." **Neurosci. Lett.** 176:89-92
- Jay T.M., F. Burette y S. Laroche (1996). "Plasticity of the hippocampal-prefrontal cortex synapses." **J. Physiol.** 90(5-6):361-6
- Jones, M.W., P.J. French, T.V. Bliss y K. Rosenblum (1999). "Molecular mechanisms of long-term potentiation in the insular cortex in vivo." **J. Neurosci.** 19(21)
- Kaczemarck y Levitan (1987).
- Kandel, E.R., J.H. Schwartz y T.M. Jessell (1991). **Principles of Neural Science.** Elsevier, 3th. Ed. USA
- Kandel, E.R. y Hawkins (1992). "The biological basis of learning and individuality". **Scientific American.** Sept.: 79-86
- Keller, A., C. Pavlides y H. Asanuma (1990). "Long-term potentiation in the cat somatosensory cortex". **NeuroReport** 1: 49-52.
- Kiefer, S.W. (1985). "Neural mediation of conditioned food aversions." **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 443: 100-109
- Komatsu, Y., K. Fujii, J. Maeda, H. Sakaguchi y K. Tomaya (1988). "Long-term potentiation of synaptic transmisión in kitten visual cortex." **J. Neurophysiol** 59:124-141
- Komatsu, Y., K. Toyama, J. Maeda y H. Sakaguchi (1981). "Long-term potentiation investigated in a slice preparation of striate cortex of young kittens." **Neurisci. Lett.** 26: 269-274
- Korol D.L., T.W. Abel, L.T. Church, C.A. Barnes y B.L. McNaughton (1993). "Hippocampal synaptic enhancement and spatial learning in the Morris swim task." **Hippocampus** 3(2):127-32
- Krettek, J.E. y J.L. Price (1974). A direct input from the amygdala to the thalamus and the cerebral cortex. **Brain Res.** 67: 169-174.

- Krnjević, K. (1986). "Amino acid transmitters: 30 years progress in research in fast and slow chemical signalling", en L.L. Iversen y E.L. Goodman (Eds.) **The Nervous System**. Oxf. Univ. Press, USA.
- Kudoh, M. y K. Shibuki (1994). "Long-term potentiation in the auditory cortex of adult rats." **Neurosci. Lett.** 171(1-2):21-3
- Lasiter, P. S., D.L. Glanzman y P. A. Mensah. (1982). Direct connectivity between pontine teste areas and gustatory neocortex in rat
- Laurie, D.J. y P.H. Seeburg (1994). "Ligand affinities at recombinant N-methyl-D-aspartate receptors depend on subunit composition." **Eur. J. Pharmacol.** 268(3): 335-45.
- LeDoux, J.E. (1993). "Emotional memory systems in the brain". **Behav. Brain Res.** 58:69-79
- Lee, S.M., M.G. Weisskopf y F.F. Ebner (1991). "Horizontal long term potentiation of responses in rat somatosensory cortex." **Brain Res.** 544: 303-310
- Liang K.C., J.L. McGaugh y H.Y. Yao (1990). "Involvement of amygdala pathways in the influence of post-training intra-amygdala norepinephrine and peripheral epinephrine on memory storage." **Brain. Res.** 508(2):225-33
- Liao, D., A. Jones y R. Malinow (1992). "Direct measurement of quantal changes underlying long-term potentiation in CA1 hippocampus". **Neuron.**9(6):1089-97.
- Lynch, G., J. Larson, S. Kelso, G. Barrionuevo y F. Schottler (1983). "Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation". **Nature**, 305:719-721.
- Madison, D.V., R.C. Malenka y R.A. Nicoll (1991). "Mechanisms underlying long-term potentiation of synaptic transmission." **Annu. Rev. Neurosci.** 14:379-97
- Malenka, R.C. (1991). "The role of postsynaptic calcium in the induction of long-term potentiation" **Mol. Neurobiol.** 5(2-4):289-95
- Malenka, R.C., J.A. Kaver, M.D. Mauk y P.T. Kelly (1989). " An essential role for postsynaptic calmodulin and protein Kinase activity in long-term potentiation". **Nature** 340 (6234): 554-557.
- Malenka, R.C., J.A. Kaver, R.S. Zucker y R.A Nicoll (1988). "Postsynaptic calcium is sufficient for potentiation of hippocampal synaptic transmission". **Science** 247, Oct. 7: 81-84.

- Malenka, R.C., B. Lancaster y R.S. Zucker (1992). "Temporal limits on the rise in postsynaptic calcium required for the induction of long-term potentiation". **Neuron**. 9(1):121-8.
- Manzoni, O.J., M.G. Weisskopf y R.A. Nicoll (1994) "MCPG antagonizes metabotropic glutamate receptors but not long-term potentiation in the hippocampus". **Europ. J. Neurosci.**, 6:1050-1054.
- Maren, S. (1996) "Synaptic transmission and plasticity in the amygdala. An emerging physiology of fear conditioning circuits". **Mol. Neurobiol.** 13 (1): 1-22
- Martin, S.J., P.D. Grimwood y R.G.M. Morris (2000)
- Martínez, J. y Derrick, B. (1996). "Long-term potentiation and learning", **Ann. Rev. Neurosci.**, 47:173-203.
- Masu, M., Y. Tanabe, K. Tsuchida, R. Shigemoto y S. Nakanishi (1991). "Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor." **Nature** 349(6312):760-5
- Mayford, M., M.E. Beach, Y.Y. Huang, L. Wang, R.D. Hawkins y E.R. Kandel (1996). "Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene" **Science** 274(5293): 1678-83.
- McCaffery, B., K. Cho, Z.A. Bortolotto, J.P. Aggleton, M.W. Brown, F. Conquet, G.L. Collingridge y Z.I. Bashir (1999). "Synaptic depression induced by pharmacological activation of metabotropic glutamate receptor in the perirhinal cortex in vitro." **Neuroscience** 93: 977-984.
- McGaugh, J.L., L. Cahill, M.B. Parent, M.H. Mesches, K. Coleman-Mesches y J.A. Salinas (1995). "Involvement of the amygdala in the regulation of memory storage". En J.L. McGaugh, F. Bermúdez-Rattoni y R.A. Prado Alcalá (Eds.), **Plasticity in the central nervous system: Learning and memory**, Mahwah N.J.: Lawrence Erlbaum Associates.
- McGaugh, J.L., I.B. Introini-Collison, A.H. Nagahara, L. Cahill, J.D. Brioni y C. Castellano (1990). "Involvement of the amygdaloid complex in neuromodulatory influences on memory storage." **Neurosci. Biobehav. Rev.** 14(4):425-31

- McLennan, H. y J. Liu (1982). "The action of six antagonists of the excitatory amino acids on neurones of the rat spinal cord." **Exp. Brain. Res.** 45(1-2):151-6
- McNaughton, B.L., C.A. Barnes, G. Rao, J. Baldwin y M. Rasmussen (1986) "Long-term enhancement of hippocampal synaptic transmission and the acquisition of spatial information". **J. Neurosci** 6(2): 563-571.
- Meldrum, B. y J. Garthwaite (1989). "Excitatory amino acids neurotoxicity and neurodegenerative disease". **Trends Pharmacol. Sci.** 11: 379-387.
- Miller, R.J. (1991). "The revenge of the kainate receptor." **Trends Neurosci.** 14(11):477-9
- Mishkin y Appenzeller (1987). "The anatomy of memory". En R.R. Llinas (Ed). **The Workings of the Brain. Development, Memory and Perception.** 1990.W.H. Freeman and Co. N.Y.
- Mitsuno, K. et al. (1994). "LTP of mossy fiber-stimulated potentials in CA3 during learning in rats", **Physiol. Behav.**, 55(4): 633-638.
- Monaghan, D.T., R. Bridges y C.W. Cotman (1989). "The excitatory amino acid receptor: their classes, pharmacology and distinct properties in the function of the central nervous system". **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 29: 314-320
- Monaghan, D.T. y C.W. Cotman (1982). The distribution of (<sup>3</sup>H) kainic acid binding sites in the rat CNS as determined by autoradiography. **Brain Res.** 252: 91-100
- Monaghan, D. T. y C. W. Cotman (1985). "Distribution of NMDA-sensitive L- H- glutamate binding sites in rat brains determined by quantitative autoradiography". **J. Neurosci.** 5: 2909-19.
- Morimoto, K., K. Sato, S. Sato, N. Yamada y T. Hayabara (1998). "Time dependent changes in neurotrophic factor mRNA expression after kindling and long-term potentiation in rats". **Brain Res. Bull.**, 45(6): 599-605.
- Morris, R. (1989). "Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning in rats and blockade of long-term potentiation *in vivo* by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5", **J. Neurosci.**, 9(9): 3040-3057.
- Morris, R.G.M., E. Anderson, G.S. Lynch y Baudry (1986) "Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5". **Nature** 297 (5868): 681-683



- Morris SH, Knevet S, Lerner EG, Bindman LJ 1999. "Group I mGluR agonist DHPG facilitates the induction of LTP in rat prelimbic cortex in vitro". **J Neurophysiol** Oct;82(4):1927-33.
- Mori, H. y M. Mishina (1995). "Structure and function of the NMDA receptor channel". **Neuropharmacology**. 34(10):1219-37.
- Moser, E., I. Mathiesen y P. Andersen (1993). "Association between brain temperature and dentate field potentials in exploring and swimming rats". **Science** 259 (50999): 1324-1326.
- Moser, E., M.B. Moser y P. Andersen (1993). "Synaptic potentiation in the rat dentate gyrus during exploratory learning". **NeuroReport** 5(3): 317-320.
- Moser, E.I., K.A. Krobert, M.B. Moser y R.G.M. Morris (1998). "Impaired spatial learning after saturation of long-term potentiation". **Science** 25, sept. 281: 2038-2042.
- Nayak, A., D.J. Zastrow, R. Lickteig, N.R. Zahniser y M.D. Browning (1998). "Maintenance of late-phase LTP is accompanied by PKA-dependent increase in AMPA receptor synthesis". **Nature**, 394 (6694): 680-683.
- Nerad, L., V. Ramírez-Anaya, C.E. Ormsby y F. Bermúdez-Rattoni (1996). "Differential effects of anterior and posterior insular cortex lesions on the acquisition of conditioned taste aversion and spatial learning." **Neurobiol Learn. Mem.** 66: 44-50
- Nicoll, R.A. y R.C. Malenka (1995). "Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus." **Nature** 377(6545):115-8
- Nowak, L., P. Bregestovski, P. Ascher, A. Herbert, A. Prochiantz (1984). "Magnesium gates glutamated activates channels in mouse central neurons" **Nature** 307 (5950): 462-465.
- O'Dell, T.J., E.R. Kandel, S.G. Grant (1991). "Long-term potentiation in the hippocampus is blocked by tyrosine kinase inhibitors." **Nature** 353(6344):558-60
- O'Keefe, J. y D.H. Conway (1978). "Hippocampal place units in the freely moving rat: why they fire where they fire." **Exp Brain Res** 31(4):573-90
- Olsen, G.M., J. Scheel-Krüger, A. Møller y L.H. Jensen (1994). "Does neuronal damage of CA1 relate to spatial memory performance of rats subjected to transient forebrain ischemia?". **Acta Neurol. Scand.** 89: 204-209

- Ormsby, C.E., A.L. Piña y F. Bermúdez-Rattoni (1991). "Long-term retrograde amnesia of inhibitory avoidance and conditioned taste aversion learning tasks by insular cortex lesions". **Soc. Neurosci. Abst.** 17: 1045.
- Otani, S. y W.C. Abraham (1989). "Inhibition of protein synthesis in the dentate gyrus, but not the entorhinal cortex, blocks maintenance of long-term potentiation in rats." **Neurosci. Lett.** 106(1-2):175-80
- Otani, S. y Y. Ben-Ari (1991). Metabotropic receptor-mediated long-term potentiation in rat hippocampal slices. **Eur. J. Pharmacol.** 205: 325
- Palfreyman, M. G. (1994) "Glutamate receptors and their regulators- an overview". En Palfreyman, M.G., I.J. Reynolda y P. Skolnick (Eds): **Direct and Allosteric Control of Glutamate Receptors**. CRC Press. USA
- Paxinos, G. Y C. Watson (1995). **The rat brain in stereotaxic coordinates**. Academic Press, Orlando, Fl.
- Perkel, D.J. y R.A. Nicoll (1993). "Evidence for all-or-none regulation of neurotransmitter release: implications for long-term potentiation." **J. Physiol.** 471:481-500
- Petralia, R.S., (1997). "Immunocytochemical localization of ionotropic glutamate receptors (GluRs) in neural circuits", en D.T. Monaghan y R.J. Wenthold (Eds) **The ionotropic Glutamate Receptors**. Humana Press, USA.
- Pin, J.P. y R. Duvoisin (1995) "Review: Neurotransmitter receptors I. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions". **Neuropharmacology** 34(1): 1-26
- Quirk G.L., J.L. Armony y J.E. LeDoux (1997). "Fear conditioning enhances different temporal components of tone-evokes spike trains in auditory cortex and lateral amygdala" **Neuron** 19(3): 613-24
- Ramírez-Amaya, V., B. Alvarez-Borda, C.E. Ormsby, R.D. Martínez, R. Pérez-Montfort y F. Bermúdez-Rattoni (1996). "Insular cortex lesions impair the acquisition of conditioned immunosuppression". **Brain Behav. Immunity** 10: 103-114.
- Ramón y Cajal, S. (1904). **Textura del Sistema Nervioso del Hombre y los Vertebrados**. Tomo II. Imprenta y librería de Nicolás Moya. Madrid.
- Regehr, W.G. y D.W. Tank (1992). "Calcium concentration dynamics produced by synaptic activation of CA1 hippocampal pyramidal cells". **J. Neurosci.** 12(11): 4202-23

- Represa A., E. Tremblay y Y. Ben-Ari (1987). "Kainate binding sites in the hippocampal mossy fibers localization and plasticity." **Neuroscience** 20(3): 739-48
- Reymann, K.G., R. Brodemann, H. Kase y H. Matthies (1988). Inhibitors of calmodulin and protein kinase C block different phases of hippocampal long-term potentiation. **Brain Res.** 461:388-392
- Richardson, S.J. (1973). "The amygdala: historical and functional analysis". **Acta Neurobiologiae Experimentalis** 33: 623-648.
- Riedel, G., W. Wetzel y K.G. Reymann (1996). "Comparing the role of metabotropic glutamate receptors in learning and memory." **Prog. Neuropsychopharm. Biol. Psychiatr.** 20: 761-89
- Riekkinen, M. y P. Jr. Riekkinen (1997). "Dorsal hippocampal muscarinic acetylcholine and NMDA receptors disrupt water maze navigation" **NeuroReport**.8:645-48
- Roberson, E.D., J.D. English y J.D. Sweatt (1996). "A biochemist's view of long-term potentiation." **Learning and Memory** 3:1-24
- Rogan, M.T., U.V. Stäubli y J.E. LeDoux (1997). "Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala". **Nature** 390 (6660): 604.607
- Roman, F., U. Staubli y G. Lynch (1987). "Evidence for synaptic potentiation in a cortical network during learning." **Brain. Res.** 418(2): 221-6
- Rosenblum, K., D.E. Berman, S. Hazi, R Lamprecht y Y. Dudai (1997). "NMDA Receptor and the tyrosine phosphorylation of its 2B subunit in taste learning in the rat insular cortex". **J. Neurosci.** 17 (13): 5129-5135.
- Scoville, W.B. y B Milner (1957). "Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions". **J. Neurol., Neurosur. Psychiatry** 20, 11-21
- Selig, D.K., H-K Lee, M.F. Bear y R.C. Malenka (1995). "Reexamination of the effects of MCPG on hippocampal LTP, LTD, and depotentiation." **J. Neurophysiol.** 74: 1075-82
- Sharp, P.E., B.L. McNaughton y C.A. Barnes (1985). "Enhancement of hippocampal field potentials in rat exposed to a novel, complex environment". **Brain Res.** 339(2): 361-365

- Shindou, T., S. Watanabe, K. Yamamoto y H. Nakanishi (1993). "NMDA receptor dependent formation of long-term potentiation in the rat medial amygdala neuron in an in vitro slice preparation." **Brain Res. Bull.** 31: 667-672
- Schoenbaum G. y H. Eichenbaum (1995). "Information coding in the rodent prefrontal cortex. I. Single-neuron activity in orbitofrontal cortex compared with that in pyriform cortex." **J. Neurophysiol.** 74(2): 733-50
- Siegel, G.L., B.W. Agranoff, R.W. Albers y P.B. Molinoff (1994). **Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular, and Medical Aspects.** Quinta edición, Raven Press, USA.
- Silva, A.J., R. Paylor, J.M. Wehner y S. Tonegawa (1992 a). "Impaired spatial learning in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice". **Science** 257 (5067): 201-206
- Silva, A.J., C.F. Stevens, S. Tonegawa y Y. Wang (1992 b). "Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice". **Science** 257(5067): 201-206
- Sommer, B., K.Keinanen, T.A. Verdoorn, W. Wisden, N. Burnasher, A. Herb, M. Köhler, T. Takagi, B Sakmann y P.H. Seeburg (1990). "Flip and Flop: a cell specific functional awitch in glutamate-operated channels of the CNS". **Science** 249: 1580-1585.
- Squire, L. (1991) **Memory and Brain.** Oxford: Oxf. Univ. Press.
- Squire, L. y Zola-Morgan, S. (1991). "The medial temporal lobe memory system". **Science**, 253:1380-1386.
- Tang Y.P., E. Shimizu, G.R. Dube, C. Rampon, G.A. Kerchner, M. Zhuo, G. Liu y J.Z. Tsien (1999). "Genetic enhancement of learning and memory in mice". **Nature** 401(6748):63-9
- Teyler, T.J., I. Cavus, C. Coussens, P. DiScenna, L. Grover, YP. Lee, Z. Little (1994). "Multideterminant role of calcium in hippocampal synaptic plasticity". **Hippocampus** 4(6):623-34.
- Travers, S.P. (1993). "Orosensory processing in neural systems of the nucleus of the solitary tract" en S.A. Simon y S.T. Roper (Eds.) **Mechanisms of Taste Transduction.** CRC Press: USA
- Tsumoto, T. (1992). "Long-term potentiation and long-term depression in the neocortex". **Prog. Neurobiol.** 39:209-228.

- Urban, N.N. y G. Barrionuevo (1996). "Induction of hebbian and non-hebbian mossy fiber long-term potentiation by distinct patterns of high-frequency stimulation". **J Neurosci.** 16(13):4293-9.
- Urban, N.N., D.A. Henze, D.A. Lewis y G. Barrionuevo (1996). "Properties of LTP induction in the CA3 region of the primate hippocampus". **Learn. Mem.** 3(2-3):86-95
- Volpe, B.T., H. P. Davis, A. Towle y W. P. Dunlap (1992) "Loss of hippocampal CA1 pyramidal neurons correlates with memory impairment in rats with ischemic or neurotoxin lesions. **Behav. Neurosci.** 106 (3): 457-464.
- Watkins, J.C., P. Krogsgaard-Larsen y T. Honoré (1990). "Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists". **Trends Pharmacol. Sci.** 11: 25-33.
- Wilson, M.A. y S. Tonegawa (1997). "Synaptic plasticity, place cells and spatial memory: study with second generation knockouts." **Trends Neurosci.** 20(3):102-6
- Yamada, K.A. y C-M Tang (1993). "Benzothiazides inhibit rapid glutamate receptor desensitization and enhance glutamatergic synaptic currents". **J. Neurosci.** 13: 3904-3915
- Yamamoto, T., Y. Fujimoto, T. Shimura y N. Sakai (1995). "Conditioned taste aversion in rats with excitotoxic brain lesions". **Neurosci. Res.** 22: 31-49
- Young, R.M. (1990). *Mind, Brain and Adaptation in the Nineteenth Century.* Oxf. Univ. Press. N.Y.

## **Apéndice A: Inducción de la LTP en la CI**

A continuación se describe el protocolo de inducción de la LTP de la vía Bla-CI empleado en el presente estudio basándose en la metodología descrita por Escobar y col. (1998).

Los animales utilizados (ratas Wistar machos de 380-400 g.) fueron anestesiados con Nembutal (50 mg/Kg/i.p.) suministrando dosis adicionales (25 mg/Kg/i.p.) cada hora a lo largo del experimento, a fin de mantener el nivel quirúrgico de anestesia. La temperatura corporal se mantuvo a 35° C con ayuda de un cojín térmico.

Las respuestas corticales fueron registradas utilizando un electrodo monopolar de acero inoxidable (0.005 pulgadas de diámetro, Medwire, Chicago, IL) para registrar las respuestas evocadas en la CI, localizada en las coordenadas estereotáxicas AP +1.2 mm, ML 5.5 mm, DV -5.5 mm  $\pm$  0.2 mm (Paxinos, 1986). Las respuestas fueron evocadas por la estimulación directa y unilateral del Bla, coordenadas AP -2.8 mm, ML -5.0mm, DV -8.5 mm  $\pm$  0.2 mm (Paxinos, 1986), mediante un electrodo bipolar de 0.005 pulgadas de diámetro (Medwire, Chicago, IL.) (Fig. A-1).

La corriente de estimulación constante fue de pulsos monofásicos de 50 a 70  $\mu$ A de 0.1-0.25 ms de duración. Esta corriente fue suministrada por un estimulador Grass S48 y liberada al electrodo de estimulación a través de una unidad de aislamiento de estímulos Grass (PSIU6). La respuesta evocada fue amplificada por un preamplificador Grass P5 serie A.C., filtrada a 0.1 -10 Hz, digitalizada a 10 puntos/ms usando una microcomputadora y almacenada para análisis off-line usando el programa Brain Wave (DataWave, Broomfield, CO). Se obtuvo la pendiente de los PPSE de campo de la CI, medida 1-3 ms después del PPSE máximo. Se determinó el 50% de la intensidad máxima de la corriente producida. Este valor fue utilizado durante estimulaciones subsecuentes, incluyendo la inducción de la LTP.

Se evocaron respuestas de baja frecuencia en intervalos de 20 segundos durante los primeros 20 minutos de línea base. Durante todo el

experimento se monitoreó el EEG. Pasado el tiempo de registro de la línea base, la inducción de la LTP se efectuó a través de la estimulación de alta frecuencia (10 trenes de 100 Hz), con un intervalo intertren de 20 segundos. Una vez aplicada la estimulación de alta frecuencia en el Bla, se registraron las respuestas evocadas durante una hora. La LTP fue analizada a través de la medición de la amplitud y la pendiente de los PPSE de campo y calculada como el porcentaje de cambio de la media de la pendiente de los potenciales con respecto a la registrada antes de la tetanización.

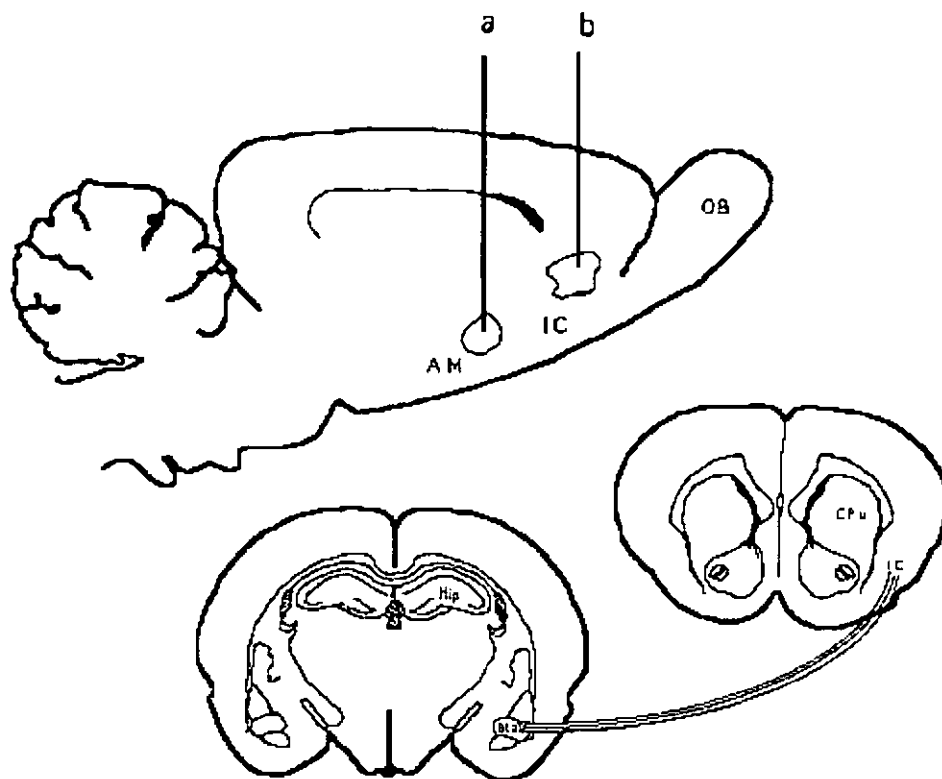


Figura A-1. Representación esquemática de las proyecciones amigdalocorticales y la ubicación de los electrodos de estimulación (a) y de registro (b) en un plano sagital (imagen superior). Los diagramas coronales muestran la comunicación entre la corteza insular y el Bla en el cerebro de rata (imagen inferior). Abreviaciones: CPu, putamen caudado; Hip, hipocampo; Am, complejo amigdaloides; CI, corteza insular; BO, bulbo olfatorio; La, núcleo lateral amigdaloides; Bla, núcleo lateral amigdaloides; BM, núcleo baso medial amigdaloides (Tomado de Escobar y col, 1998).

Los resultados del presente estudio han sido parcialmente publicados.

“The NMDA receptor antagonist CPP impairs conditioned taste aversion and insular cortex long-term potentiation in vivo”. *Brain Research* 812 (1998) 246-251.

Martha L. Escobar, Ileana Alcocer, Vincent Chao





ELSEVIER

Brain Research 812 (1998) 246–251

BRAIN  
RESEARCH

Short communication

## The NMDA receptor antagonist CPP impairs conditioned taste aversion and insular cortex long-term potentiation in vivo.

Martha L. Escobar <sup>\*</sup>, Ileana Alcocer, Vincent Chao

*Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70-253 C.P. 04510, Mexico, D.F., Mexico*

Accepted 25 August 1998

### Abstract

It has been proposed that long-term potentiation (LTP) a form of activity-dependent modification of synaptic efficacy, may be a synaptic mechanism for certain types of learning. Recent studies on the insular cortex (IC) a region of the temporal cortex implicated in the acquisition and storage of conditioned taste aversion (CTA), have demonstrated that tetanic stimulation of the basolateral nucleus of the amygdala (BLA) induce an *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) dependent LTP in the IC of adult rats in vivo. Here we present experimental data showing that intracortical administration of the NMDA receptor competitive antagonist CPP (-3(-2 carboxypiperazin-4-yl)-propyl-1-phosphonic acid) disrupts the acquisition of conditioned taste aversion, as well as, the IC-LTP induction in vivo. These findings are of particular interest since they provide support for the view that the neural mechanisms underlying NMDA dependent neocortical LTP, constitute a possible mechanism for the learning related functions performed by the IC. © 1998 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

**Keywords:** NMDA receptor; Long-term potentiation; Conditioned taste aversion; Insular cortex; CPP; Basolateral amygdaloid nucleus

Long lasting changes in synaptic strength, such as long term potentiation (LTP), are thought to underlie learning and memory [7]. LTP is a form of activity-dependent synaptic plasticity that has been investigated mainly in the hippocampus [7], and a similar phenomenon has also been observed in the rat and cat neocortex [3,9,21,23] were the modifications that subservise certain forms of learning and memory are likely to reside.

The insular cortex (IC) is a region of the temporal cortex in the rat, corresponding to Krieg's areas 13 and 14 that has been implicated in the acquisition and storage of different aversive motivated learning tasks like conditioned taste aversion, spatial maze and inhibitory avoidance [5,6,16]. The IC receives direct projections from the basolateral (BLA) amygdaloid nucleus [4,5,16,24] and it is well established that both the amygdaloid complex and the IC contribute to the formation and retention of taste illness memories [4,5].

Conditioned taste aversion (CTA) is a very robust and widely used model for the study of learning and memory

processes [18]. In this behavioral model, an animal acquires aversion to a novel taste when it is followed by digestive malaise. The anatomical substrates responsible for CTA learning have been well established [22]. In this regard, it has been shown that bilateral lesion of the IC disrupts acquisition and retention of CTA [8,35]. Since IC lesions do not produce obvious deficits in gustatory or gastrointestinal sensibility, it has been suggested that IC lesions impair the mnemonic representation of tastes and their post gastrointestinal consequences [22].

The search for mechanisms in neocortex that change synaptic efficacy and produce associative learning through activity-dependent processes has focused on the role of glutamate receptors of the *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) type. NMDA receptor activation is necessary for the induction of long-term potentiation in hippocampus and neocortex [1,20,32]. The competitive NMDA antagonist CPP (-3(-2 carboxypiperazin-4-yl)-propyl-1-phosphonic acid) has been widely used to block the induction of LTP in many pathways in the brain [12,15,19,20,31] as well as to disrupt the behavioral performance of different learning paradigms [26,29,33].

Recently we showed that in vivo tetanic stimulation of the basolateral nucleus of the amygdala induce LTP in the insular cortex of adult rats, increasing significantly synap-

<sup>\*</sup> Corresponding author. Fax: +52-5-6225607; E-mail: mescobar@fisiol.unam.mx

tic responses to low frequency stimulation during a period of at least 1 h after conditioning training. Tetanus-induced LTP in this preparation was blocked by application of the NMDA receptor antagonists, suggesting that IC displays LTP through the activation of the NMDA receptors [15]. These results suggest that in vivo tetanus induced LTP of the Bla-IC projection is a possible mechanism for the memory related functions performed by the insular cortex.

The aim of the present study was to investigate whether the NMDA receptor antagonist CPP could induce impairment of the acquisition of taste aversion learning task in a similar manner to its impairment of in vivo IC-LTP.

A total of 8 male Wistar rats, weighing 380–400 g, were prepared for this experiment. IC responses were isolated similarly as previously described [15]. Briefly, prior to surgery, animals were kept in single cages on an ad libitum feeding schedule with a 12/12 h light-dark cycle. Animals were anesthetized with Nembutal (50 mg/kg i.p.) and given supplemental Nembutal injections (25 mg/kg) at 1 h intervals to maintain a surgical level of anesthesia. Body temperature was maintained at 35°C with a heating pad. IC responses were recorded unilaterally by using a monopolar stainless steel electrode (0.005 in. diameter, Medwire, Chicago, IL) placed at the following stereotaxic coordinates (AP +1.2 mm, ML 5.5 mm, DV  $-5.5 \pm 0.2$ ) Paxinos and Watson [28]. Responses were evoked via direct and unilateral stimulation of the Bla at coordinates (AP -2.8, ML -5.0, DV  $-8.5 \pm 0.2$ ) Paxinos and Watson [28] using a stainless steel bipolar electrode (0.005 in. diameter, Medwire, Chicago IL) (Fig. 1). Constant current stimulation (50–70  $\mu$ A monophasic pulses, 0.1–0.25 ms duration) was provided by a Grass S48 stimulator and delivered to the stimulating electrode through a Grass Stimulus Isolation Unit (PSIU6). The evoked responses were amplified on a Grass P5 series A.C. preamplifier, filtered at 0.1 Hz–10 Hz, digitized (10 points/ms) using a microcomputer, and then stored for off-line analysis using BrainWave software (DataWave, Broomfield, CO). The IC evoked responses were measured by obtaining the field EPSP slope measured 1–3 ms after the EPSP onset. The current intensity that elicited a 50% maximal response was determined and used for all subsequent stimulation, including induction of LTP. Low-frequency responses then were evoked once every 20 s throughout a 20 min baseline period. EEG was monitored during the whole experiment. LTP was induced by delivering ten (1-s 100 Hz) trains with an intertrain interval of 20 s. Following delivery of high-frequency Bla stimulation, evoked responses were collected for an additional hour. LTP was calculated as a percentage of change with respect to the mean slope of field potentials before tetanization.

The animals were divided in the following treatment groups: Vehicle group (VEH,  $n = 4$ ) that underwent surgery, had electrodes implanted and received high frequency stimulation in the presence of i.p. phosphate buffer solution (PBS) as vehicle. 1 h prior to high frequency

stimulation; CPP group (CPP,  $n = 4$ ) that received the same treatment as the VEH group and the competitive NMDA receptor antagonist CPP (10 mg/kg, i.p., Tocris Cookson, Bristol, UK) 1 h prior to high frequency stimulation. CPP was prepared in PBS as vehicle.

In a second part of the experiment, 23 animals were trained in the conditioned taste aversion paradigm. Animals were implanted bilaterally with 23 gauge stainless steel cannulae under anesthesia (Nembutal, 50 mg/kg i.p.) using standard stereotaxic procedures. The tips of the guide cannulae were aimed to 5 mm above the IC. For all groups, microinjections were delivered through a 30-gauge dental needles as microinjectors that extended 5 mm below the previously implanted guide cannulae (reaching the IC area). Dental needles microinjectors were attached by polyethylene tubing to a 10  $\mu$ l Hamilton syringe which, in turn, was driving by a microinfusion pump (Carnegie Medicin, MA). Intracortical infusions were given to hand restrained conscious animals. After surgery animals were allowed to recover for 5 days.

Upon completing the behavioral experiments, cannulated animals were histologically analyzed in order to verify the injector tip location (Fig. 1).

A previously described experimental procedure for CTA was used [5,16]. Briefly, animals were deprived of water for 24 h and trained to drink water twice a day, during 10-min trials for four days. On the acquisition day, the cannulated animals were divided in two groups, receiving either CPP (0.03  $\mu$ g per hemisphere, Tocris Cookson, Bristol, UK) ( $n = 8$ ) or PBS ( $n = 8$ ) 1 h before the presentation of a novel taste (saccharine 0.1%; Sigma, WI). There was an additional control group that remained intact during the whole procedure ( $n = 7$ ). Ten minutes later the animals received 7.5 ml/kg i.p. of a 0.15 M solution of LiCl which induces digestive malaise. After four more days of baseline consumption, the water was substituted newly by a 0.1% saccharine solution to test the aversion. The reduction of saccharine consumption with respect to baseline intake was used as a measure of strength of aversion.

The IC field EPSP consisted of small  $0.31 \pm 0.007$  mV (mean  $\pm$  S.E.M.) potentials elicited with (50–70  $\mu$ A) current intensities and displayed an onset of 2–3 ms and a peak at approximately 7–9 ms, with an average slope of  $0.081 \pm 0.003$  (mean  $\pm$  S.E.M.). Tetanic stimulation (1 s trains of 100 Hz) of the Bla, induced LTP in the IC of VEH group, the field potential in IC showed an increase in the synaptic responses to low frequency stimulation (amplitude  $0.48 \pm 0.005$  mV; slope  $0.127 \pm 0.002$ ) (mean  $\pm$  S.E.M.), immediately after and during a period of at least 1 h after the conditioning tetanus (Fig. 2).

As can be seen in Fig. 2, tetanus-induced LTP in this preparation was blocked by application of the NMDA receptor antagonist CPP, as compared with vehicle group. ANOVA analysis for slope increases after conditioning tetanus revealed highly significant differences between

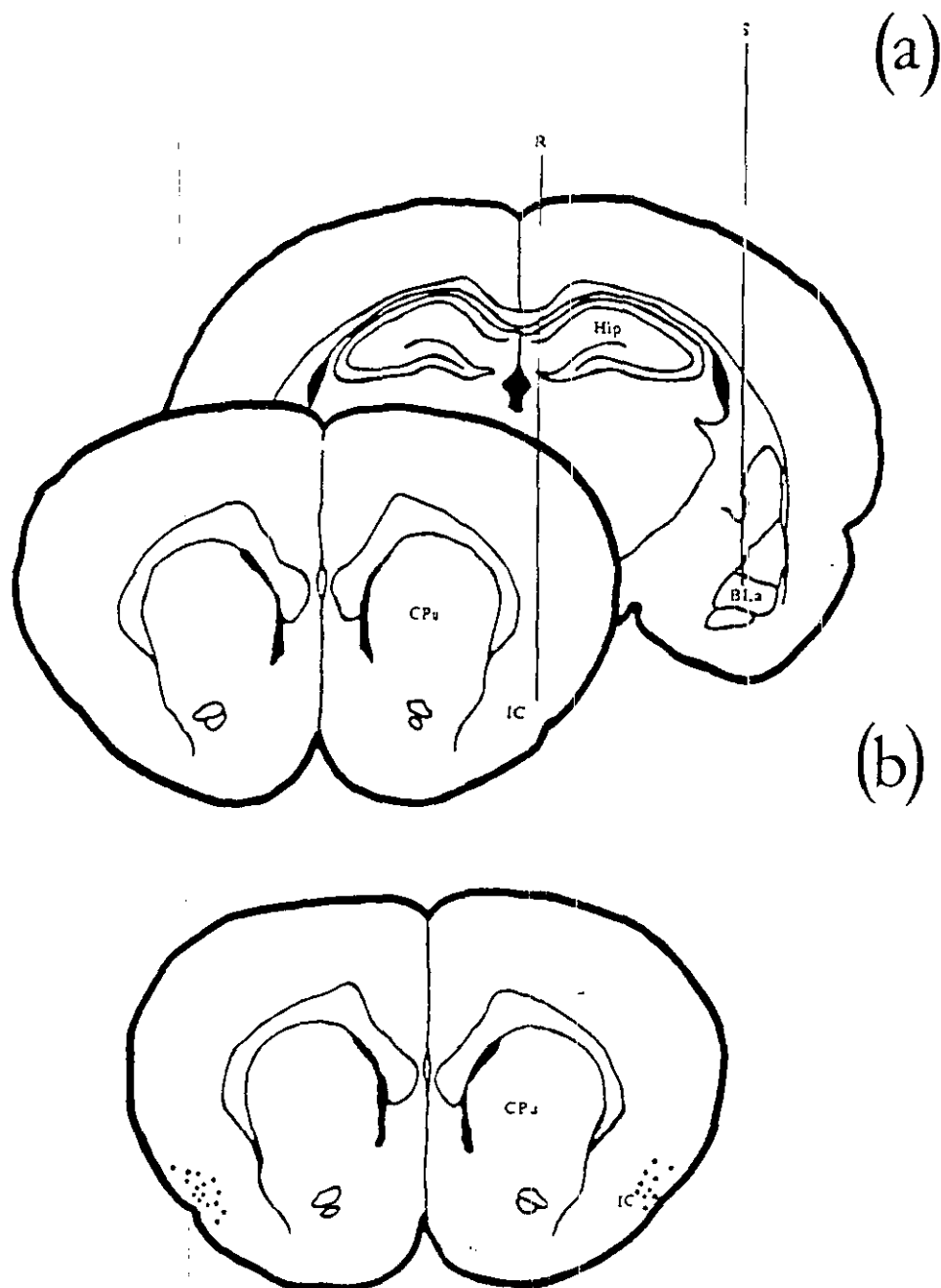


Fig. 1. Schematic representation of the electrode (a) and the IC needle tips (b) placements for the animals used in this study. Abbreviations are: Bla—basolateral amygdaloid nucleus, CPu—caudate putamen, Hip—hippocampus, IC—insular cortex, R—recording site, S—stimulating site.

groups,  $F_{1,6} = 184.334$ ;  $p < 0.0001$ , suggesting that IC-LTP induction is dependent on NMDA receptors. Fisher's test showed significant differences between CPP and VEH groups  $p < 0.0001$ . The magnitude of the slope for CPP and VEH groups after conditioning tetanus were respectively  $95.78 \pm 0.78$ , and  $158.81 \pm 0.85$  (mean  $\pm$  S.E.M.).

No significant differences among groups were found neither in the baseline water intake nor during the first presentation of the conditioned stimulus (saccharine flavored solution during the CTA acquisition). As shown in

Fig. 3 during the retention trial (CTA test), significant differences among groups were found  $F_{2,20} = 25.569$ ;  $p < 0.0001$ . Analysis post-hoc with Fisher test showed that the CPP treated group had a significant disruption in the acquisition of taste aversion as indicated by the increased saccharine consumption when compared with the control and vehicle groups ( $p < 0.0001$ ).

LTP is an example of activity-dependent plasticity that was discovered in the hippocampal formation and a similar form of synaptic plasticity has been found in the neocortex

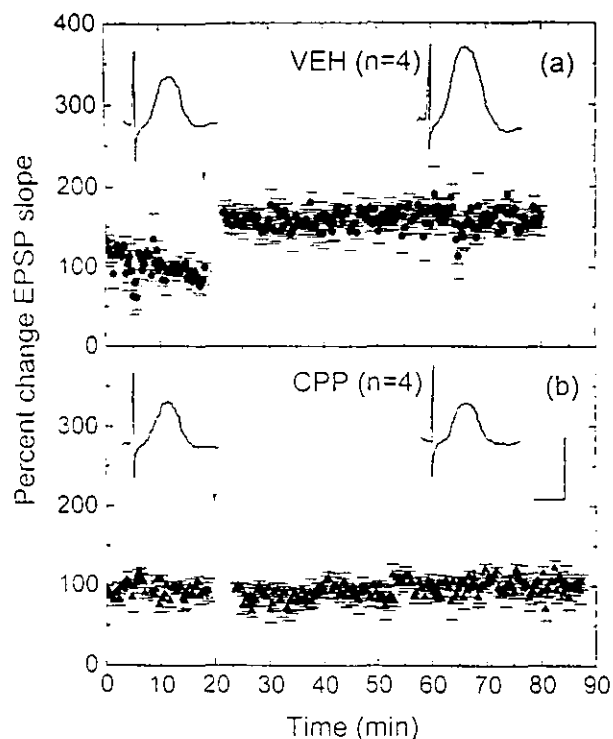


Fig. 2. Effect of CPP on LTP of amygdalo-cortical (Bla-IC) responses in vivo. (a) Point-plot of Bla-IC evoked responses from sham animals which received vehicle 1 h prior to delivery of conditioning trains. LTP was observed following the conditioning train. (b) Point-plot of insular cortex evoked responses from animals which received CPP 1 h prior to delivery of conditioning trains. LTP of Bla-IC response was blocked by CPP. The top of each graphic shows examples of representative EPSP's responses from IC immediately before and 60 min after the delivery of conditioning train. The percent change in EPSP slope for VEH and CPP groups after conditioning tetanus were respectively  $158.81 \pm 0.85$  and  $95.78 \pm 0.78$  (mean  $\pm$  S.E.M.). Scale bars: 9 ms, 0.4 mV.

[1.3.9]. There is growing evidence that LTP may represent the cellular substrate for at least some kinds of learning and memory, so the cellular mechanisms involved in LTP formation have been proposed as a possible physiological mechanism underlying memory formation.

At present, the activation of NMDA receptors, the influx of  $Ca^{2+}$  into postsynaptic sites, the activation of  $Ca^{2+}$  activated protein kinases, activation of phosphatidylinositol turnover and membrane-associated cytoskeletal proteins are mechanisms that are hypothesized to play a principal role in the induction of LTP in neocortex [32].

In agreement with our previous results the present study confirm that tetanus-induced IC-LTP was blocked by application of the NMDA receptor antagonist CPP, suggesting that IC-LTP induction is dependent on NMDA receptors. The role of NMDA receptor in the induction of hippocampal and neocortical LTP has been well established. It has been widely demonstrated that the NMDA receptor plays a crucial role in the induction of LTP in

many pathways in the brain. Thus, the administration of NMDA receptor antagonists as 2-amino-5-phosphonovalerate (AP5) [1.3.9], CPP [14.15] or dizocilpine maleate (MK-801) [15.25] among others, produced the blockade of LTP induction in hippocampal and neocortical pathways.

The IC has been related to the cognitive processing involved in the acquisition of CTA [5.22]. In the present experiments, we have shown that pretraining microinjections of CPP into the insular cortex result in a strong disruption in the CTA test. These results strongly suggest the involvement of NMDA receptors during the CTA acquisition. These results are in agreement with those reported by Rosenblum et al. [30] who found that reversible blockade of NMDA receptors in the insular cortex during training of conditioned taste aversion impaired CTA acquisition, whereas blockade of NMDA receptors in an adjacent cortex or before the retrieval test had no effect, further supporting the notion that the NMDA receptor is involved in taste learning in the insular cortex in behaving animals [30].

In this regard, a number of reports have demonstrated the participation of NMDA receptors during the actual behavioral expression of memory storage of several learning tasks. Ward et al. [33] observed that CPP produced a disruption of radial arm maze performance in rats. CPP was also showed to induce impairment of the response in the one-trial inhibitory avoidance test [26]. Riekkinen and Riekkinen Jr. showed that bilateral dorsal hippocampal infusions with CPP disrupted behavioral performance in water maze task in rats [29]. In addition Gao et al. [17], observed that CPP exert time-dependent effects on the

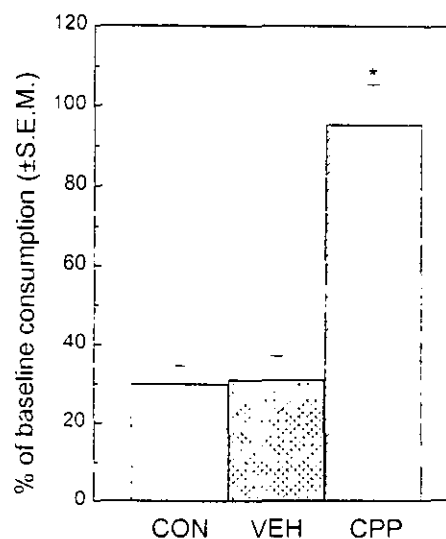


Fig. 3. Effect of CPP pre-training microinjections on conditioned taste aversion. Animals received either intracortical infusion of vehicle or CPP 1 h before the first presentation of saccharine solution. An additional control group remained intact during the whole procedure. CON: intact control; VEH: vehicle control group and CPP: CPP treated group. \*  $p < 0.0001$

expression of immediate early genes in rat brain, suggesting its early involvement in neural plasticity.

It has been reported that the restricted blockade of hippocampal NMDA receptors disrupts performance on different tests of spatial learning and have suggested that the resulting impairments could be attributable to a disruption of endogenous NMDA-dependent long-term potentiation [26,29,33]. However scarce information exists on the possible relationship between LTP induction and learning processing mediated by NMDA receptors in neocortical areas.

The present results showed that intracortical administration of the NMDA receptor antagonist CPP could induce impairment of the acquisition of taste aversion learning task in a similar manner to its impairment of acute *in vivo* IC-LTP. These results are in agreement with those reported by Morris [27] and Davis et al. [13] who showed that chronic infusion of the NMDA receptor antagonist D-AP5 into the lateral ventricle impairs spatial learning and hippocampal LTP *in vivo*. Although several lines of evidence are consistent with an important role for LTP in certain forms of learning and memory, a conclusive answer cannot be given at this time.

In this regard, it has been proposed that LTP mechanisms may contribute to naturally occurring experience-dependent synaptic modifications in the neocortex, thus, the LTP observed in motor cortex has been suggested as forming an important part of the basis of motor learning [2,21] since this cortical area is thought likely to be involved in the learning of motor skills. Woody [34] also has suggested that associative LTP may form the basis of the acquisition of the eye-blink conditioned reflex in sensorimotor cortical neurons. Chen and co-workers had suggested that LTP is a possible mechanism for the visual memory and pattern recognition functions performed in the human temporal cortex [11]. Charpier and Deniau proposed that LTP at excitatory cortico-striatal inputs should favor the initiation of movements and therefore could be critical for the functions of basal ganglia in motor learning [10].

In summary, our results showed that intracortical blockade of NMDA receptors by CPP administration disrupts the acquisition of conditioned taste aversion, a type of learning known to depend on the integrity of the IC, in a similar manner as it disrupts the Bla-IC LTP induction *in vivo*. These findings are of particular interest since they provide support for the view that the neural mechanisms underlying NMDA dependent neocortical LTP constitute a possible mechanism for the learning related functions performed by the IC.

#### Acknowledgements

This work was supported by DGAPA IN206095.

#### References

- [1] A. Artola, W. Singer. The involvement of *N*-methyl-D-aspartate receptors in induction and maintenance of long-term potentiation in rat visual cortex. *Eur. J. Neurosci.* 2 (1990) 254–269.
- [2] H. Asanuma, C. Paulides. Neurobiological basis of motor learning in mammals. *NeuroReport* 8 (1997) 1–4.
- [3] M.F. Bear, A. Kirkwood. Neocortical long-term potentiation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 3 (1993) 197–202.
- [4] F. Bermúdez-Rattoni, I.B. Introni-Collison, K. Coleman-Mesches, J.L. McGaugh. Insular cortex and amygdala lesions induced after aversive training impair retention: effects of degree of training. *Neurobiol. Learn. Memory* 67 (1997) 57–63.
- [5] F. Bermúdez-Rattoni, J.L. McGaugh. Insular cortex and amygdala lesions differentially affect acquisition of inhibitory avoidance and conditioned taste aversion. *Brain Res.* 549 (1991) 165–170.
- [6] F. Bermúdez-Rattoni, C.E. Orrisonby, M.L. Escobar, E. Hernández-Echeagaray. The role of insular cortex in the acquisition and long lasting memory for aversively motivated behaviors. in: J.L. McGaugh, F. Bermúdez, R.A. Prado-Alcalá (Eds.), *Plasticity in the Central Nervous System: Learning and Memory*. Lawrence Erlbaum Associates, Hillsdale, NJ, 1995, pp. 67–82.
- [7] T.V.P. Bliss, G.L. Collingridge. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361 (1993) 31–39.
- [8] J.J. Brown, P.S. Lasiter, S.W. Kiefer. The gustatory neocortex of the rat. *Physiol. Psychol.* 10 (1982) 13–45.
- [9] M. Castro-Alamancos, B.W. Connors. Short-term synaptic enhancement and long-term potentiation in neocortex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93 (1996) 1335–1339.
- [10] S. Charpier, J.M. Deniau. *In vivo* activity-dependent plasticity at cortico-striatal connections: evidence for physiological long-term potentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94 (1997) 7036–7040.
- [11] W.R. Chen, S. Lee, K. Kato, D.D. Spencer, G.M. Sheperd, A. Williamson. Long-term modifications of synaptic efficacy in the human inferior and middle temporal cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93 (1996) 8011–8015.
- [12] S. Davis, T.V. Bliss, G. Dutreux, S. Laroche, M.L. Errington. Induction and duration of long-term potentiation in the hippocampus of the freely moving mouse. *J. Neurosci. Methods* 75 (1997) 75–80.
- [13] S. Davis, S.P. Butcher, R.G.M. Morris. The NMDA receptor antagonist D-2-amino-5-phosphonopentanoate (D-AP5) impairs spatial learning and LTP *in vivo* at intracerebral concentrations comparable to those that block LTP *in vitro*. *J. Neurosci.* 12 (1992) 21–34.
- [14] M.L. Escobar, E.J. Barea-Rodríguez, B.E. Derrick, J.A. Reyes, J. Martínez. Opioid receptor modulation of mossy fiber synaptogenesis: independence from long-term potentiation. *Brain Res.* 751 (1997) 330–335.
- [15] M.L. Escobar, V. Chau, F. Bermúdez-Rattoni. *In vivo* long term potentiation in the insular cortex: NMDA receptor dependence. *Brain Res.* 779 (1998) 314–319.
- [16] M.L. Escobar, J. Fernández, R. Guevara-Aguilar, F. Bermúdez-Rattoni. Fetal brain grafts induce recovery of learning deficits and connectivity in rats with gustatory neocortex lesion. *Brain Res.* 478 (1989) 368–374.
- [17] X. Gao, T. Hashimoto, C.A. Tamminga. Phencyclidine (PCP) and Dizocilpine (MK-801) exerts time-dependent effects on the expression of immediate early genes in rat brain. *Synapse* 29 (1998) 14–28.
- [18] J. García. Learning without memory. *J. Cog. Neurosci.* 2 (1990) 287–305.
- [19] R.V. Hernández, B.E. Derrick, W.A. Rodríguez, J.L. Martínez Jr., CPP, and NMDA receptor antagonist, blocks the induction of commissural-CA3 LTP in the anesthetized rat. *Brain Res.* 656 (1994) 215–219.
- [20] S. Hrabětová, T.C. Sacktor. Long-term potentiation and long-term depression are induced through pharmacologically distinct NMDA receptors. *Neurosci. Lett.* 25 (1997) 107–110.

- [21] A. Iriki, C. Paulides, A. Keller, H. Asanuma, Long-term potentiation in the motor cortex, *Science* 245 (1991) 1385–1387.
- [22] S.W. Kiefer, Neural Mediation of conditioned food aversions, *Ann. New York Acad. Sci.* 443 (1990) 100–109.
- [23] A. Kirkwood, M.G. Rioult, M.F. Bear, Experience-dependent modification of synaptic plasticity in visual cortex, *Nature* 381 (1996) 526–528.
- [24] J.E. Krettek, J.L. Price, A direct input from the amygdala to the thalamus and the cerebral cortex, *Brain Res.* 67 (1974) 169–174.
- [25] S.M. Lee, M.G. Weiskopf, F.F. Ebner, Horizontal long-term potentiation of responses in rat somatosensory cortex, *Brain Res.* 544 (1991) 303–318.
- [26] A. Mele, C. Castellano, A. Felici, S. Cabib, S. Caccia, A. Oliverio, Dopamine-*N*-methyl-*D*-aspartate interactions in the modulation of locomotor activity and memory consolidation in mice, *Europ. J. Pharmacol.* 308 (1996) 1–12.
- [27] R.G.M. Morris, Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning in rats and blockade of long-term potentiation in vivo by the *N*-methyl-*D*-aspartate receptor antagonist AP5, *J. Neurosci.* 9 (1989) 3040–3057.
- [28] G. Paxinos, C. Watson, *The rat brain in stereotaxic coordinates*, Academic Press, Orlando, 1986.
- [29] M. Riekkinen, P. Riekkinen Jr., Dorsal hippocampal muscarinic acetylcholine and NMDA receptors disrupt water maze navigation, *NeuroReport* 8 (1997) 645–648.
- [30] K. Rosenblum, D.E. Berman, S. Hazvi, R. Larnprecht, Y. Dudai, NMDA receptor and the tyrosine phosphorylation of its 2 B subunit in taste learning in the rat insular cortex, *J. Neurosci.* 17 (1997) 5129–5135.
- [31] T. Shindou, S. Watanabe, K. Yamamoto, H. Nakanishi, NMDA receptor-dependent formation of long-term potentiation in the rat medial amygdala neuron in an in vitro slice preparation, *Brain Res. Bull.* 31 (1993) 667–672.
- [32] T. Tsumoto, Excitatory aminoacid transmitters and their receptors in neural circuits of the cerebral neocortex, *Neurosci. Res.* 9 (1990) 79–102.
- [33] L. Ward, S.E. Mason, C. Abraham, Effects of the NMDA antagonists CPP and MK-801 on radial arm maze performance in rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 35 (1990) 785–790.
- [34] C.D. Woody, Understanding the cellular basis of memory and learning, *A. Rev. Psychol.* 37 (1986) 433–493.
- [35] T. Yamamoto, R. Matsuo, Y. Kawamura, Localization of cortical gustatory area in rats and its role in taste discrimination, *J. Neurophysiol.* 44 (1980) 440–454.