

UCH-FC  
MAG-B  
A. 167  
C. 1

**Corteza olfatoria de la amígdala: plasticidad sináptica durante el desarrollo postnatal y su modulación por la experiencia sensorial**

**Tesis**

**Entregada A La**

**Universidad De Chile**

**En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos**

**Para Optar Al Grado De**

**Magíster en Ciencias Biológicas**

**Facultad De Ciencias**

**Por**

**María Belén Aburto Ponce**

**Agosto, 2014**

**Director de Tesis**

**Dra. Magdalena Sanhueza Tohá**



**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**INFORME DE APROBACION**  
**TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata.

**María Belén Aburto Ponce**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día jueves 22 de mayo de 2014

Director(a) de Tesis:  
Dra. Magdalena Sanhueza Tohá.

*M. Sanhueza Tohá*  
.....

Co-Director de Tesis:  
Dr. Juan Bacigalupo Vicuña.

*J. Bacigalupo Vicuña*  
.....

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Cecilia Vergara.

*C. Vergara*  
.....

Dr. Julio Alcayaga.

*J. Alcayaga*  
.....



*A mi querida familia.*

## Resumen Biográfico



Nací el 2 de noviembre de 1986, en Santiago. En mi niñez pude disfrutar de un gran patio trasero en mi casa, de manera que, con mi hermano Pedro Pablo, nos entretuvimos viendo bichos, animalitos y plantas de todo tipo. Mi madre motivó dichas andanzas, por lo que mi curiosidad por los seres vivos aumentó. En la enseñanza media, conocí a mi profesor de Biología Jorge Avilés, cuyo entusiasmo por la biología y su gran dedicación como profesor, me estimularon a estudiar esa área. Al entrar a la Universidad de Chile, ingresé a la carrera de Licenciatura en Ciencias c/m en Biología. Lo que me determinó a dedicarme con todas mis fuerzas a la neurofisiología, sería el ramo de Neurobiología que tuve en segundo año, con el profesor Julio Alcayaga. De esa manera fue como llegué a realizar mi unidad de investigación y esta tesis al Laboratorio de Fisiología Celular.

## Agradecimientos:

Este trabajo no hubiera sido posible si no fuera por el apoyo que he recibido durante su desarrollo. En primer lugar, a todos los miembros del laboratorio de Fisiología Celular, que su unión y alegría levantaron el ánimo y las ganas de seguir trabajando. En especial a Jorge Vera, Daniel Karmelić, Gabriela Pino, Germán Fernández y Daniel Estrada, muchas gracias por su amistad y compañerismo en los buenos y malos momentos, y esas conversaciones motivadoras cuando el cansancio acechaba.

Al profesor Ricardo Delgado, le agradezco su gran disposición a resolver las dudas de los alumnos en cualquier momento. Al profesor Julio Alcayaga y a Daniel Karmelić les agradezco profundamente su disposición y desinteresada ayuda en el análisis bioestadístico de este trabajo, ya que invirtieron una gran cantidad de tiempo en orientarme. A los integrantes del Laboratorio de Biología del Conocer, Dr. Mpodozis, profesor Marín, Pedro Fernández y Alfonso Deichler por su gran ayuda y disposición del laboratorio en los experimentos histológicos.

A la profesora Cecilia Vergara le agradezco su gran dedicación a nuestro grupo de trabajo y al profesor Juan Bacigalupo, mi co-tutor, el apoyo y su humor.

A mi tutora, la "profe Magda", le agradezco enormemente su apoyo, su guía paciencia y dedicación a mi formación como estudiante. Enseñarme a tomar con humildad los resultados para saber qué es lo pasa, apartando sabiamente la soberbia de querer tener la razón, es sin duda el mejor legado científico. Le agradezco también la confianza que tenía en mi trabajo, pues eso me enseñó a confiar en mí, y eso es muy difícil de aprender. Me hizo crecer como no solo como estudiante sino también como persona. Por todo eso, ¡gracias profe Magda!

Finalmente, les agradezco a mi familia y amigos su apoyo y su unión, porque siempre serán un refugio de tranquilidad para mí. A mi pololo Yerko, muchas gracias por su paciencia, ánimo y consuelo en esos momentos de desesperación, quien fue sin duda el que se llevó todas las privaciones de tiempo, me vio en mis peores momentos, y me apoyó en todo. A todos les doy gracias por su comprensión por las ausencias en varios compromisos, y su paciencia al reagentarlos para poder integrarme.

## Índice de Materias

1. Lista de Tablas.....	vi
2. Lista de Figuras.....	vii
3. Lista de Símbolos, Abreviaturas y Nomenclatura.....	viii
4. Resumen.....	x
5. Abstract.....	xii
6. Introducción.....	1
7. Materiales y Métodos.....	12
8. Resultados.....	20
8.1. Inducción de LTP a durante el primer mes de vida postnatal.....	20
8.2. Contribución de las distintas vías sinápticas a los potenciales evocados en ACo.....	30
8.3. Evaluación de las posibles modificaciones en la transmisión sináptica basal por la deprivación olfatoria.....	35
9. Discusión.....	43
10. Conclusión.....	58
11. Bibliografía.....	59

## Lista de Tablas

<b>Tabla I.</b> Para cada rango de edad se presentan los valores de la transmisión sináptica post-inducción de las vías prueba y control.....	22
---	----

## Lista de Figuras

Figura 1. Esquema de cortes coronales del complejo de la amígdala de Cerebro de rata.....	6
Figura 2. Montaje del registro de rebanadas e inducción de LTP.....	21
Figura 3. Porcentaje de LTP inducida a lo largo del primer mes de vida postnatal.....	23
Figura 4. El grado de potenciación depende de la edad postnatal.....	24
Figura 5. Durante el primer mes el grado de potenciación primero aumenta y posteriormente vuelve a caer.....	27
Figura 6. La contribución de las sinapsis asociativas al estimular la capa Ia aumenta con la edad.....	32
Figura 7. Tinción de Nissl de rebanadas de cerebro de rata a P11.....	34
Figura 8. Marcaje de vías aferentes y cuerpos celulares.....	36
Figura 9. La deprivación olfativa temprana no afecta la transmisión sináptica basal a P21-25.....	38
Figura 10. Efecto de la deprivación sensorial en la inducción de potenciación hacia fines del primer mes.....	40



## Lista de símbolos, Abreviaturas o Nomenclatura

Hz : hertz

min : minuto

mL : mililitro

mM : milimolar

MΩ : megaohmio

ms : milisegundo

mV : milivolt

μM : micromolar

ACo : Corteza olfatoria de la amígdala

AMPA : amino-3-hydroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico, agonista

AMPAR : receptor de glutamato tipo AMPA

BLA : complejo basolateral de la amígdala

BO : bulbo olfatorio

CE : núcleos centromediales de la amígdala

CP : corteza piriforme

ES : Error estándar

fEPSP : potencial postsináptico excitatorio de campo (Field excitatory postsynaptic potential)

GABA-A : receptor de ácido  $\gamma$ -aminobutírico tipo A

GABA-B : receptor de ácido  $\gamma$ -aminobutírico tipo B

LA : núcleo lateral de la amígdala

LTD : depresión a largo plazo

LTP : potenciación a largo plazo

NMDA : N-Metil-D-Aspartato, agonista

NMDAR : receptor de glutamato tipo NMDA

TBS : estimulación en *theta burst*

TOL : tracto olfatorio lateral

## RESUMEN

Existe evidencia que hay distintas regiones del cerebro implicadas en formación de memorias, y que uno de los mecanismos celulares subyacentes es la potenciación a largo plazo (LTP). Una de estas regiones podría ser la corteza olfatoria de la amígdala (ACo), la cual es una estructura de tres capas que recibe aferencias directas del bulbo olfatorio a través del tracto olfatorio lateral (TOL), y que se ha vinculado con el aprendizaje emocional olfativo (condicionamiento del miedo).

En este trabajo se estudió la plasticidad sináptica en las conexiones TOL-ACo y se investigó su regulación por la experiencia olfatoria. Para ello, se registraron los potenciales sinápticos de campo en rebanadas de cerebro de ratas de 6 a 34 días. La inducción de LTP fue evaluada mediante estimulación presináptica ("theta-burst"). En ratas en edades de P11-15 y P16-25 hubo LTP, presentándose en P16-25 el nivel promedio de potenciación más alto (~30%). En torno al final del primer mes postnatal (P26-34), el protocolo de inducción de LTP no produjo, en promedio, niveles significativos de potenciación.

La modulación de la plasticidad por la experiencia sensorial se evaluó mediante privación olfativa, por medio de la oclusión de una narina. La transmisión basal no se vio alterada, pero sí hubo cambios significativos en el porcentaje de cambio por la inducción de LTP, donde el hemisferio ipsilateral y contralateral a la privación, en edades de P26-34, presentaron potenciación significativa. Los niveles de LTP en el hemisferio contralateral fueron, en promedio, un nivel mayor, comparado con ratas *naïve* a esa misma edad.

Nuestros resultados demuestran la existencia de un periodo crítico de inducción de LTP de las aferencias olfatorias a la amígdala. Esto se define como una ventana temporal en el desarrollo postnatal del animal donde sólo en esa etapa es posible inducir potenciación. Empieza en edades tempranas (P11-15) y se cierra al finalizar el primer mes de desarrollo postnatal. Nuestros resultados también sugieren que este periodo crítico es regulado por la experiencia olfativa, y que la deprivación sensorial gatilla procesos compensatorios, extendiendo el periodo crítico en animales deprivados

## ABSTRACT

Different brain regions are involved in memory formation and one of the underlying cellular mechanisms is long-term potentiation (LTP). The anterior cortical nucleus of the amygdala (ACo) is a three-layered structure that receives direct input from the olfactory bulb via the lateral olfactory tract (LOT) and has been linked to olfactory emotional learning (fear conditioning).

In this work, synaptic plasticity in the LOT-ACo connections was assessed and its regulation by olfactory experience was investigated. For this, field synaptic potentials were recorded in brain slices obtained from 6 to 34 days-old rats. The induction of LTP was evaluated by presynaptic "theta-burst" stimulation. Significant LTP was observed at P11-15 (~15%), P16-20 (~26%) and P21-25 (~32%). However, around the end of the first postnatal month (P26-34), the LTP induction protocol did not produce, on average, significant levels of strengthening.

A possible modulation of plasticity by sensory experience was evaluated by conducting olfactory deprivation through the occlusion of one nostril. Basal transmission was not altered, but significant differences were observed in the induction of LTP, as both the hemisphere ipsilateral to the deprivation as well as the contralateral showed significant enhancement at P26-34. LTP levels in the contralateral hemisphere were, on average, higher compared to *naïve* rats of the same age.

Our results demonstrate the existence of a critical period for the induction of LTP in the olfactory afferents to the amygdala. This means that just during a time window in the postnatal development of the animal it is possible to induce synaptic potentiation. The critical period starts at early ages (P11-15) and closes at the end of the first month. Our results also suggest that this critical period is regulated by olfactory experience, as sensory deprivation appears to trigger compensatory processes that extend the critical period in deprived animals.

Nuestros resultados demuestran la existencia de un periodo crítico de inducción de LTP de las aferencias olfatorias a la amígdala. Esto se define como una ventana temporal en el desarrollo postnatal del animal donde sólo en esa etapa es posible inducir potenciación. Empieza en edades tempranas (P11-15) y se cierra al finalizar el primer mes de desarrollo postnatal. Nuestros resultados también sugieren que este periodo crítico es regulado por la experiencia olfativa, y que la privación sensorial gatilla procesos compensatorios, extendiendo el periodo crítico en animales privados.

## INTRODUCCIÓN

Uno de los principales temas de investigación en el área de la neurociencia es el aprendizaje y la memoria, y cómo estos procesos forman y modifican la conducta de un animal. Desde un punto de vista experimental, la formación de una memoria puede constatarse al observar un cambio conductual causado por la experiencia, siendo el aprendizaje el proceso de adquisición de memoria (Okano y cols., 2000). Estos procesos están, por lo tanto, estrechamente relacionados, y explican en parte las diferentes conductas que pueden existir en un individuo. Las investigaciones han mostrado que existen distintos tipos de memoria (declarativa, de procedimiento, autobiográfica, emocional, entre otras), y que tanto su formación como posterior evocación dependen de distintas zonas del cerebro. Una de estas regiones es el complejo de la amígdala: un grupo heterogéneo de núcleos que se ubica en la parte medial del lóbulo temporal (Pitkänen y cols, 1997; Swanson y Petrovich, 1998). Distintos experimentos en los que se ha extirpado esta parte del cerebro, así como lesiones puntuales en ella, muestran que este complejo está relacionado con el comportamiento emocional, el estrés, el aprendizaje asociativo y la memoria emocional, particularmente la relacionada con el miedo (McDonald, 1998; LeDoux, 2000; Paré, 2003; Sah y cols, 2003). Todos estos antecedentes han incitado a investigar esta región del cerebro como un posible locus de formación y almacenamiento de memoria.

### *Bases Neuronales del Aprendizaje y Memoria.*

Una de las grandes incógnitas con respecto a la memoria es cómo se forma y se almacena la información. Gradualmente se ha construido una respuesta, en primer lugar gracias



a hallazgos clínicos: A partir de casos de pacientes que sufrieron extracción quirúrgica de alguna parte del cerebro debido a una enfermedad farmacológicamente intratable, y sus particulares problemas de memoria posteriores a la intervención, se sospechó que diferentes zonas del cerebro tenían distintos roles en la formación y el almacenamiento de la información, como el hipocampo. Posteriormente, Bliss y Lømo (1973) descubrieron la potenciación a largo plazo (long-term potentiation, LTP), que es un aumento persistente (horas) de la transmisión sináptica glutamatérgica, que fue inducido experimentalmente por ellos en hipocampo de conejo. El método experimental consistía en aplicar una breve estimulación eléctrica de alta frecuencia (30-100 Hz, por 3-4 segundos) a los axones de la vía perforante (provenientes de la neocorteza), mientras se registraba la respuesta sináptica en la capa molecular del giro dentado. Como había evidencia de que el hipocampo era un lugar del cerebro vinculado con la memoria, se postuló a la LTP como un mecanismo celular que se desencadena durante la formación de memoria. Con el tiempo, se han descubierto diferentes tipos de LTP<sup>1</sup>, así como la existencia de depresión a largo plazo (long-term depression, LTD), siendo esta última una disminución de la transmisión sináptica que persiste en el tiempo y que se puede inducir experimentalmente tanto en rebanadas de cerebro como *in vivo*, mediante una estimulación de baja frecuencia; por ejemplo, 1 Hz por 15 minutos (Bear y Malenka, 1994). Se le denomina plasticidad sináptica a la propiedad de las sinapsis químicas de presentar cambios en la transmisión sináptica (ya sea LTP o LTD) que dependen de su propia actividad, y se le ha atribuido una importante participación en la formación de memorias.

Dos grupos de investigación han demostrado que el aprendizaje desencadena procesos tipo LTP en el hipocampo, de modo que la transmisión es selectivamente potenciada después del

---

<sup>1</sup> Se han descrito distintos tipos de plasticidad sináptica: LTP y LTD dependientes de receptores glutamatérgicos de tipo NMDA (NMDAR-LTP y NMDAR-LTD, respectivamente), LTD dependiente de receptores glutamatérgicos metabotrópicos y LTP dependiente de receptores gabaérgicos, los cuales tienen diferentes vías de señalización. Sin embargo, en esta tesis sólo se abarcará la NMDAR-LTP como modelo celular de plasticidad sináptica involucrado en la formación de memoria.

aprendizaje, y posteriormente no se puede inducir LTP en esas conexiones (Whitlock y cols., 2006; Gruart y cols., 2006). De manera similar, se ha visto que tanto el aprendizaje asociativo como la inducción de LTP por estimulación eléctrica de las proyecciones auditivas tálamo-amigdalares, producen la potenciación de las respuestas evocadas por estímulos acústicos en el núcleo lateral de amígdala (LA) (Rogan y LeDoux, 1995; Rogan y cols., 1997). También se ha visto que el bloqueo farmacológico de la vía de señalización que produce la inducción de LTP inhibe el aprendizaje (Rumpel y cols., 2005).

Otro antecedente que relaciona a la plasticidad sináptica con los procesos de memoria, es el tipo de modificaciones estructurales que se producen en las sinapsis tanto por la inducción experimental de LTP como por el aprendizaje. Se ha comprobado que en ambos casos hay un aumento en el tamaño de espinas dendríticas, aunque durante el aprendizaje se observa además aparición de nuevas espinas y desestabilización de grupos de sinapsis (Zhang y Poo, 2001; Hensch, 2004; Caroni y cols., 2012). Por lo tanto, es factible pensar que tanto los procesos de LTP como los cambios morfológicos asociados a ésta, contribuyen, al menos en parte, a la formación de memoria.

Interesantemente, se ha visto en algunas regiones del cerebro que la inducción de plasticidad sináptica (tanto funcional como estructural) tiene un periodo crítico, es decir, una ventana temporal durante la vida postnatal temprana, dentro de la cual los circuitos neuronales muestran una mayor susceptibilidad a la modificación. En estas regiones sólo se puede inducir plasticidad sináptica en este periodo, o bien la inducción es mayor que en etapas posteriores (Hensch, 2004; Caroni y cols., 2012). Las propiedades plásticas y el periodo crítico han sido

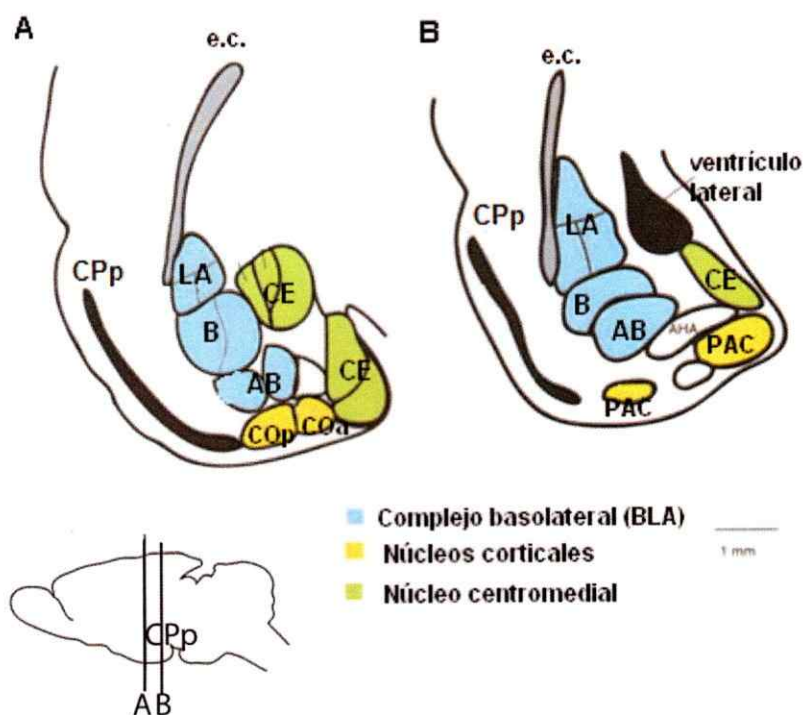
estudiados al evaluar la participación de las cortezas sensoriales en la memoria y también en relación al desarrollo y estabilización de las conexiones sinápticas en estas cortezas (Kirkwood y cols., 1995; Hensch, 2005).

Para el estudio de la memoria y el aprendizaje en animales despiertos, un paradigma ampliamente usado es el condicionamiento del miedo pavloviano (LeDoux, 2000). Este entrenamiento consiste en exponer a un animal simultáneamente a un estímulo neutro (estímulo condicionado, EC) (por ejemplo, un sonido) y a un estímulo aversivo (estímulo no condicionado, EN), teniendo como resultado que el animal responda al estímulo neutro (EC) como si fuera un estímulo con relevancia biológica (EN). Antes del condicionamiento, el animal presenta frente al estímulo aversivo una respuesta conductual estereotipada, la inmovilidad por algunos segundos (*freezing*); ante el estímulo neutro, no tiene esa respuesta. Después de sucesivas exposiciones simultáneas de ambos estímulos, la sola presentación del estímulo condicionado provocará en el animal la misma reacción provocada por el estímulo no condicionado. Este condicionamiento funcionaría en todos los *phyla* y se ha estudiado mayormente con estímulos auditivos neutros (LeDoux, 2000).

### *Estímulos Olfativos y el Complejo de la Amígdala*

Este complejo consta de 12 núcleos (Figura 1), los cuales reciben aferencias (ya sea directa o indirectamente) de distintas cortezas sensoriales. La corteza olfatoria de la amígdala (ACo), al igual que los otros núcleos superficiales del complejo, posee una organización estratificada en capas. A estos núcleos superficiales de la amígdala suele llamárseles también núcleos tipo corteza (Sah y cols., 2003), pues presentan una organización celular intermedia

entre núcleo y corteza. Si bien éstos presentan una distribución donde se disponen diferencialmente cuerpos celulares y axones aferentes e intracorticales, esta organización es menos ordenada que otras regiones corticales (como la adyacente corteza piriforme), y por ello los límites de las capas son menos claros (Swanson y Petrovic, 1998). La capa I es la más superficial y allí se encuentran las dendritas apicales de las neuronas de proyección o principales, cuyos somas se ubican en capas más profundas, así como los axones provenientes del bulbo olfatorio (BO), localizados en la subcapa I<sub>a</sub> (la más externa) y las fibras de asociación intracorticales (capa Ib). Las capas II y III son capas laminares constituidas por los somas de las células principales e interneuronas (Shipley y Ennis, 1996; McDonald, 1998; Sah y cols., 2003). Los núcleos amigdalares más profundos (como el complejo basolateral de la amígdala, BLA) no reciben entradas directas desde el BO, sin embargo, reciben proyecciones desde ACo, de manera que estarían recibiendo información del olfato por medio de este núcleo. En el laboratorio se han realizado estudios sobre las propiedades electrofisiológicas de las neuronas principales de la capa II de ACo, mostrando que aproximadamente el 70% de las neuronas analizadas presentan oscilaciones subumbrales intrínsecas del potencial de membrana en el rango de frecuencia bajo-*theta beta* (3-20Hz; Sanhueza y Bacigalupo, 2005); también se han descrito propiedades de resonancia neuronal en el rango theta (Vera y cols., 2014). Estos antecedentes sugieren la participación de ACo en la formación de la memoria, pues estas características electrofisiológicas están presentes en otras partes del cerebro cuya implicancia en el aprendizaje y la memoria está b, como el hipocampo y la corteza entorrinal, y se ha visto que estas propiedades rítmicas facilitan la inducción de LTP (Otto y cols., 1991; Huerta y Lisman, 1993).



**Figura 1: esquema de cortes coronales del complejo de la amígdala de cerebro de rata.** Se observa un corte anterior (A) y otro posterior (B). Se muestra el complejo basolateral (BLA: azul), con sus componentes, los núcleos lateral (LA), basal (B) y accesorio-basal (AB); las zonas corticales de la amígdala (amarillo), que incluyen el núcleo cortical anterior (COa), posterior (COPp), la corteza periamigdaloides (PAC); y el grupo de núcleos centromedial (CE: verde). e. c., cápsula externa; CPP, corteza piriforme posterior. Extraído y modificado de Sah y col., 2003.

### *LTP y función de la amígdala en el condicionamiento del miedo*

En nuestro laboratorio se realizaron las primeras pruebas de plasticidad en las sinapsis de la capa I<sub>a</sub> entre axones de neuronas del BO y las neuronas de la capa II de ACo, donde se observó que estas sinapsis presentan tanto facilitación de corto plazo inducida mediante pulsos pareados (PPF), como LTP (Carolina Oliva, datos no publicados). Sin embargo, no se ha estudiado sistemáticamente si la LTP puede ser inducida en forma reproducible en ACo ni su evolución a lo largo del primer mes de vida postnatal. Varias investigaciones se han focalizado

en la corteza piriforme, que es la mayor corteza que recibe aferencias olfatorias del bulbo (CP; ver Figura 1). Sin embargo, muy pocos estudios describen zonas corticales de la amígdala, como ACo y la corteza periamigdaloides (PAC), que como se dijo anteriormente, también reciben proyecciones directas desde el BO. En corteza piriforme, mediante experimentos de *voltage-clamp* en rebanadas de cerebro de rata, se ha visto que en las sinapsis formadas por los terminales de axones del tracto olfatorio lateral (TOL) y las dendritas de las neuronas piramidales (sinapsis aferentes), existe un periodo crítico de la inducción de plasticidad en rebanadas que termina antes del final del primer mes de vida postnatal (Poo e Isaacson, 2007). Además, también se ha descrito que en el transcurso de este periodo crítico de inducción de LTP hay modificaciones dependiente de la experiencia en la parte postsináptica de las sinapsis aferentes, específicamente ocurre un incremento en la contribución de receptores de ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico (AMPA) con respecto a los receptores de N-metil D-aspartato (NMDAR) (Franks e Isaacson, 2005). En corteza somatosensorial sucede un fenómeno parecido, se puede inducir LTP en las aferencias tálamo-corticales dentro de las primeras semanas de vida y, paralelo a este proceso, hay un cambio en la contribución de los NMDAR a las corrientes sinápticas (Feldman y cols., 1999). En la capa III de corteza visual existe un periodo crítico de inducción de LTP en rebanadas que dura hasta P35, y se ha visto que para animales criados en obscuridad, este periodo crítico se extiende más allá de P35, lo que sugiere que la posibilidad o no de inducir plasticidad está determinada por la historia previa de modificaciones sinápticas dependientes de la experiencia (Kirkwood y cols., 1995). Como la corteza piriforme y ACo comparten características similares, ya que ambas cortezas reciben aferencias olfatorias y presentan una organización en tres capas, podría pensarse que los procesos de plasticidad son similares. Sin embargo, estas regiones también presentan ciertas diferencias estructurales (capas menos ordenadas en ACo que en piriforme). Por otro lado, el origen embriológico y evolutivo de estas regiones olfatorias es distinto: la corteza piriforme

procede del telencéfalo mientras que el complejo de la amígdala procede de una composición entre telencéfalo y diencefalo (García-Moreno y cols., 2010), por lo que las propiedades fisiológicas de la corteza piriforme y las de ACo podrían ser diferentes.

Es poca la información que se tiene acerca del papel de ACo en fenómenos de aprendizaje. No obstante, el condicionamiento del miedo por estímulos visuales (contextual) y auditivos ha sido extensamente estudiado. Se sabe que en este proceso están involucrados los núcleos lateral (LA) y basal (B)<sup>2</sup>, denominados en conjunto complejo basolateral de la amígdala (BLA), y la región centromedial. Es importante destacar que las proyecciones de estos sentidos provienen en su mayoría desde cortezas de asociación y del tálamo, más que de cortezas primarias: en el sistema auditivo provienen desde el área Te3 en corteza auditiva y el núcleo geniculado medial talámico, mientras que la información del sistema visual surge de Oc2 (área talámica visual). Estas áreas proyectan a los núcleos de la amígdala antes mencionados. A su vez, el núcleo central (CE) recibe aferencias de BLA, y proyecta al tronco encefálico, actuando como salida del complejo de la amígdala a sectores del tronco encefálico que controlan la expresión del miedo (Sah y cols, 2003; LeDoux, 2000).

Se han realizado escasas investigaciones que se centren en el condicionamiento olfativo del miedo y en la plasticidad en las zonas a las cuales llegan aferencias olfatorias directas. Se ha visto que hay un aumento de la actividad neuronal (medida por inmunoreacción de *c-fos*) en la región corticomedia de amígdala en ratas expuestas al olor de un depredador, que se

---

<sup>2</sup> Existe una clasificación mucho más completa del complejo de la amígdala, y las conexiones de las regiones mencionadas anteriormente se organizan a nivel de subnúcleos más que a nivel de núcleos. Sin embargo para términos prácticos, en esta tesis se mencionará sólo la clasificación a nivel de núcleo según Sah y col. (2003).

correlaciona con la conducta de miedo que presenta el animal al exponerse a ese olor. Estos experimentos fueron realizados en animales que no fueron expuestos al olor del depredador previamente, por lo que el complejo de la amígdala estaría participando en una expresión del miedo innato (Dielenberg y cols., 2001). En cuanto a la participación de ACo aprendizaje asociativo del miedo, un estudio en ratas demostró que el condicionamiento del miedo olfativo induce en ACo un aumento persistente de los potenciales evocados por estimulación de BO *in vivo*, tanto en ausencia como en presencia del olor al cual han sido condicionados los animales. Algo diferente ocurre con la corteza piriforme y BLA, que aunque uno recibe aferencias olfatorias y el otro es un núcleo clave en el condicionamiento del miedo para otras modalidades sensoriales, después de este condicionamiento sólo muestran un aumento de los potenciales evocados durante la exposición al estímulo condicionado (Sevelinges y cols., 2004). Los potenciales evocados aumentados en ACo independientemente de la presencia del olor condicionado, pueden ser producto del aprendizaje asociativo efectuado, que no se realiza en BLA ni en CP. Estos antecedentes sugieren que ACo participa en el aprendizaje asociativo generado durante el condicionamiento del miedo mediante estímulos olfatorios, pero no es claro qué parte del proceso está mediando, como tampoco se sabe si ese aporte es dependiente de la experiencia. La información que se tendría al caracterizar la plasticidad en ACo ayudaría a vislumbrar si esta región olfatoria tiene efectivamente el potencial para generar cambios plásticos y si éstos son dependientes de la experiencia previa, como los que subyacen a procesos de memoria y aprendizaje.

Los datos publicados indican una posible contribución de ACo al condicionamiento del miedo, mediante una potenciación de las sinapsis de las vías aferentes. A su vez, es posible que las propiedades plásticas de ACo cambien con la experiencia sensorial durante el primer mes de



vida, de manera que exista un periodo crítico para la inducción de plasticidad, como ocurre en la corteza visual y CP (Kirkwood y cols, 1995; Poo e Isaacson, 2007). Es decir, que después de un tiempo de vida del animal expuesto a experiencias olfativas, ya no sea posible inducir LTP, o que el nivel de potenciación inducida sea menor.

En este trabajo se hizo la primera aproximación sistemática para describir la plasticidad sináptica en la corteza olfatoria de la amígdala, a lo largo del primer mes de vida postnatal. Con ese propósito, se registró la actividad sináptica evocada por estimulación eléctrica de las aferencias olfatorias en ACo, a distintas edades durante el primer mes postnatal, y se evaluó la LTP inducida en función de la edad. Posteriormente, se evaluó el efecto de la privación olfatoria sobre la transmisión sináptica basal, ya que se ha visto cómo la experiencia sensorial influye en la plasticidad sináptica y la formación de circuitos (Crair y Malenka, 1995; Carmignoto y Vicini, 1992). Varias investigaciones en donde se priva a un animal de algún sentido o se interrumpen las aferencias que constitutivamente van hacia algún blanco dentro del sistema nervioso, muestran que se producen modificaciones de las sinapsis en ese blanco, producto de la ausencia de actividad de esas aferencias (Kirkwood y cols., 1995; Feldman y cols., 1999; Franks e Isaacson, 2005). Esto podría pasar de la misma manera en ACo, pues recibe directamente aferencias olfatorias, de manera que una privación de ese tipo de estímulos podría generar una alteración del desarrollo de la conectividad general en ACo, que se podría manifestar a través de cambios en la transmisión sináptica basal o en la plasticidad.

### *Hipótesis.*

La corteza olfatoria de la amígdala presenta plasticidad sináptica que depende de la etapa del desarrollo postnatal y es modulable por la experiencia sensorial olfatoria.

### *Objetivo General*

Estudiar la evolución de la plasticidad sináptica en la corteza olfatoria de la amígdala durante el primer mes de vida postnatal de la rata. Evaluar la modulación de la transmisión basal y plasticidad sináptica por la experiencia olfativa.

### *Objetivos específicos*

1.- Describir la potenciación a largo plazo (LTP) inducida a través del desarrollo postnatal en las conexiones olfatorias de la amígdala. Evaluar si existe un período crítico que favorezca la inducción de LTP.

2.- Evaluar posibles modificaciones producidas por la privación sensorial en la transmisión sináptica basal y la potenciación inducida.

## MATERIALES Y METODOS

### *Preparación de rebanadas para registros electrofisiológicos.*

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley de entre 6 y 34 días de edad. Los animales fueron adquiridos en el vivero de la P. Universidad Católica, y fueron anestesiados con éter y sacrificados por decapitación, en concordancia con las normas éticas aprobadas por CONICYT. Los cerebros fueron rápidamente removidos y transferidos a una cámara de disección conteniendo líquido cefalorraquídeo artificial (LCRA) de disección frío (0-4 °C), cuya composición era (en mM): NaCl 83, KCl 2.5, MgSO<sub>4</sub> 3.3, CaCl<sub>2</sub> 0.5, NaHCO<sub>3</sub> 25, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25, glucosa 10, sacarosa 72. (pH 7.4, por saturación con 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>). Utilizando un vibrátomo se obtuvieron cortes coronales de 400 µm que contuvieran la corteza olfatoria de la amígdala (ACo; ver Sanhueza y Bacigalupo, 2005). Las rebanadas fueron mantenidas a 36°C en LCRA de disección oxigenado, durante al menos 2 horas antes de ser utilizadas para los registros. La composición del LCRA normal fue (en mM): NaCl 125, KCl 2.5, MgCl<sub>2</sub> 1, CaCl<sub>2</sub> 2, NaHCO<sub>3</sub> 25, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25 y glucosa 10, pH 7,4.

### *Registros electrofisiológicos.*

Los potenciales postsinápticos de campo (fEPSPs) fueron registrados por medio de un amplificador diferencial 1800 A-M SYSTEMS, con filtros de ancho de banda de 1Hz-5kHz. Se utilizaron electrodos de Ag/AgCl en capilares de borosilicato (diámetro: 30-40 µm) llenos con LCRA, que se ubicaron en la zona más externa de la capa I (región I<sub>a</sub> de ACo). Los axones del

bulbo olfatorio fueron estimulados por pulsos de corriente generados por un estimulador Isostim A320 WPI. Los electrodos de estimulación (Platino/Iridio, 0.2-0.3 M $\Omega$ ) se ubicaron en la misma capa I<sub>a</sub>, a unos 200  $\mu$ m del electrodo de registro. En todos los experimentos se registró la transmisión basal utilizando una intensidad de estimulación que evocó un fEPSP de un 60% del valor máximo observado, ya sea por saturación de la respuesta o aparición del potencial de acción compuesto post-sináptico o *population spike*. La frecuencia de estimulación fue de 0,05 Hz. En experimentos en que se indujo LTP se utilizó un segundo electrodo de estimulación para activar un grupo diferente de conexiones sinápticas, que se usó como control de la estabilidad del registro (vía control).

Para los registros en los cuales se evaluó la LTP, circularon 15 mL de LCRA burbujeados con 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>, junto con el bloqueador de los receptores GABA-A picrotoxina (100  $\mu$ M). Las rebanadas estuvieron sumergidas en una cámara de registro en aproximadamente 2 mL de LCRA, a no menos de 34°C. Para los experimentos que examinaron la contribución de las sinapsis asociativas en la transmisión basal, se agregó además baclofeno (30 $\mu$ M), un agonista de los receptores GABA-B, usado ampliamente para aislar las sinapsis intracorticales de las aferentes, por su efecto sobre receptores presinápticos. Los datos fueron adquiridos y analizados por el programa Igor Pro 6.12 y los análisis estadísticos se obtuvieron a través del programa Graphpad Prism 5.01.

#### *Construcción de curvas de entrada-salida e inducción de plasticidad sináptica.*

Las curvas de entrada-salida (E/S) se pueden obtener al construir un gráfico que relaciona la amplitud de la vola presináptica (potencial de acción compuesto de los axones



provenientes del BO), y la pendiente del fEPSP evocado en la capa I<sub>a</sub> de ACo (respuesta postsináptica producida por descarga de neurotransmisor sináptico). Si la amplitud de la vola presináptica resulta difícil de cuantificar, se puede construir la curva E/S graficando la respuesta postsináptica en función de la intensidad de la corriente de estimulación. La pendiente de las curvas entrada-salida en su rango lineal constituye una medida relativa de la eficiencia sináptica, lo que permite hacer una comparación de la transmisión sináptica entre rebanadas provenientes de hemisferios cerebrales deprivados y no deprivados, para determinar si la deprivación olfatoria produce un cambio en la transmisión sináptica basal.

La inducción de LTP se realizó por medio de estimulación presináptica: se utilizó un protocolo de *theta burst stimulation* (TBS), que consiste en la aplicación de 10 *burst* de pulsos (1 *burst* = 5 pulsos, 100 Hz) en que los *burst* son aplicados a una frecuencia de 5 Hz. En total se dieron 4 trenes compuestos por 10 *burst*, cada tren separado por 30 segundos. La intensidad de la estimulación durante los protocolos de inducción de plasticidad fue la misma que durante los periodos de registro de la transmisión basal ajustada en cada experimento.

#### *Cuantificación de la transmisión sináptica, porcentaje de cambio, porcentaje de LTP y métodos estadísticos empleados*

La medición de la transmisión sináptica puede ser por la amplitud o la pendiente del fEPSP evocado. En todos los experimentos la evaluación de la transmisión sináptica fue a través de la cuantificación de la pendiente del fEPSP evocado de la vía prueba y control. Esto es porque la medición de la pendiente posee una menor variabilidad por el ruido eléctrico, así como una menor alteración al llegar a la *population-spike*. Para determinar si hubo LTP en cada

experimento, se compararon los valores de las pendientes del potencial evocado en las vías prueba y control (normalizadas con respecto de su respectiva basal) entre 20 y 30 minutos después de la aplicación del protocolo de TBS. Los valores de las pendientes normalizadas (30 registros por vía) se compararon mediante una prueba t de Student para datos pareados.

Los experimentos fueron agrupados por rangos de edad de 5 o 10 días. Para determinar si en un cierto rango de edad existía una potenciación sináptica estadísticamente significativa, se realizaron análisis de datos pareados de la transmisión promedio de la vía prueba y control (pendiente normalizada promedio) en el intervalo 20-30 min post inducción, considerando todos los experimentos del rango de edad (prueba t de Student para datos pareados).

La magnitud del cambio de la transmisión sináptica (porcentaje de cambio: % de cambio) en cada experimento, se cuantificó respecto de la vía control en el mencionado período de tiempo. El % de cambio por rango de edad se calculó como el promedio de los %LTP de los experimentos correspondientes a ese rango mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de cambio} = \frac{\text{prueba}}{\text{control}} - 1 \times 100$$

Donde “prueba” y “control” corresponde al valor de los 20-30 minutos post-inducción de la transmisión de la vía prueba y control promedio para cada rango de edad. Para comparar los % de cambio entre distintos rangos de edad, se realizó un ANOVA de una vía (paramétrica o no paramétrica según el caso) y se utilizó la prueba post hoc de Bonferroni o Dunn. Los valores de la transmisión sináptica normalizada de la vía prueba y control por rango de edad, y del % de cambio por rango de edad indicadas en el texto corresponden al promedio  $\pm$  error estándar. El criterio de la significancia estadística fue con un  $p < 0,05$ . El % de cambio fue considerado un

porcentaje de LTP (%LTP) en un rango de edad cuando la transmisión promedio de la vía prueba fue significativamente distinta con respecto a la vía control.

Para constatar que los cambios en el potencial evocado fueran un fenómeno postsináptico, se monitoreó la volemia presináptica; aquellos experimentos en donde la volemia cambió más de un 5% después del TBS con respecto a su basal, se descartaron para la cuantificación.

Para evaluar los efectos de la privación sensorial olfativa en la plasticidad sináptica, se ocupó un protocolo "débil" de inducción de LTP, el cual consistió en un TBS modificado: se aplicó un único tren con 10 *bursts* a 5 Hz. (cada *burst* con las mismas características descritas anteriormente). Después de 20 minutos de haber aplicado el TBS "débil", se aplicó el protocolo de inducción de LTP "fuerte", que es el TBS estándar utilizado en los experimentos de plasticidad a través de la edad.

#### *Marcaje del tracto olfatorio lateral in vitro con biocitina*

Protocolo modificado de Chang y cols. (2000): Similarmente a la preparación de rebanadas para registros electrofisiológicos, ratas de P11-P13 y P20 fueron anestesiadas y rápidamente decapitadas. El cerebro fue extraído y transferido a una cámara de disección con LCRA de disección frío (0-4°C) y burbujeado con 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>. En la cámara se extrajo el cerebelo y parte de corteza anterior, y posteriormente la sección del cerebro que contenía a ACo fue transferido a una cámara de mantención con LCRA burbujeado con 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub> a 25 °C, cuya composición era (en mM): 124 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 glucosa, 1,25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2

$\text{CaCl}_2$ ,  $26 \text{ NaHCO}_3$ . Se mantuvo allí por al menos 30 minutos. Transcurrido ese tiempo, el cerebro se dispuso en una placa de Petri con LCRA de mantención oxigenado, con su lado anterior hacia arriba, y con ayuda de una lupa, se introdujo rápidamente un cristal de biocitina (Ne-biotinil-L-lisina; Sigma) en el TOL de un hemisferio, mientras el otro hemisferio se mantuvo como control. Posteriormente, el cerebro se regresó a la cámara de mantención con la parte anterior hacia arriba, y se dejó por 6-8 horas. Transcurrido ese tiempo se fijó en paraformaldehído al 4% en buffer fosfato (PBS) 0,1 M (pH 7,4), por dos días. Después de ese tiempo, los cerebros fueron embebidos en sacarosa al 30% en buffer fosfato 0,1 M, y cortados en plano coronal (60  $\mu\text{M}$ ) en un micrótopo Leitz.

#### *Detección de Biocitina:*

Las secciones cortadas se dispusieron en placas de 6 pocillos y fueron procesadas con el método del complejo avidina-biotina-peroxidasa. Las rebanadas fueron lavadas por 10 minutos en PBS, y posteriormente fueron incubadas por 20 minutos en peróxido de hidrógeno al 30% para saturar la actividad peroxidasa endógena. Luego fueron lavadas 3 veces por 10 minutos (3 x 10 minutos), tras los cuales se incubaron con la mezcla de avidina-biocitina en PBS con Tritón X-100 al 0,3% por 3 horas. Luego se lavaron con PBS 3 x 10 minutos. Las rebanadas reaccionaron entonces con diaminobenzidina (DAB) 0,4% en PBS, en presencia de 0,01% de peróxido de hidrógeno y 0,04% de cloruro de níquel, por 5-10 minutos. Los tejidos fueron entonces lavados con PBS 3 x 15 minutos para detener la reacción. Finalmente, las secciones fueron montadas en portaobjetos de microscopio, secadas por 1 día y cubiertas con cubreobjetos (en el caso de las rebanadas que no fueron teñidas con Nissl) o preparadas para la tinción con Nissl.



*Tinción de Nissl (o contratinción):*

Para la tinción de Nissl, ratas de P11 y P20 días fueron anestesiadas con ketamina/xilaxina 4 mg/0,2 mg por 100g de animal y ketamina/xilaxina 4 mg/0,8 mg por 100g de animal, respectivamente. Fueron perfundidas con PFA al 4% en PBS. El cerebro fue extraído y embebido en sacarosa al 30% en PBS para posteriormente ser seccionado en rebanadas de 60  $\mu$ m ocupando un micrótopo Leitz. Las secciones obtenidas de esta manera, o aquellas que fueron reveladas con DAB (ver tratamiento anterior) fueron montadas en portaobjetos gelatinizados y secados por 1 día. Luego se dejaron en cloroformo por una hora, fueron hidratadas a través de alcoholes graduados (100, 95, 70, 50%; 3, 3, 4, 4 minutos), agua destilada por 4 minutos e inmediatamente teñidas con violeta de cresilo al 0,75%. Después se lavaron con agua destilada y deshidrataron con alcoholes graduados (50, 70, 95 x 2 y 100% x 2; 1 minuto cada uno). Por último, se dejaron reposar en xilol por una hora, se cubrieron con cubreobjeto y Permount (Sigma-Aldrich). Los cortes y las imágenes de éstos fueron obtenidas con el microscopio confocal, todo esto por cortesía del Laboratorio de Biología del Conocer (Dr. Jorge Mpodozis, Gonzalo Marín, Pedro Fernández).

*Deprivación sensorial.*

La deprivación sensorial fue realizada en animales de 1 o 4 días. Las crías fueron traídas con la madre desde el Vivero Central PUC y al primer o cuarto día se procedió a la oclusión nasal. Para esto, se anestesió a los animales por hipotermia por contacto físico con hielo por 3-4 minutos, y luego se tapó una vía nasal con un tapón adherente (o mediante cauterización), de manera que las rebanadas que salieron del hemisferio ocluido sirvieron para los experimentos de prueba y el otro hemisferio fue utilizado como control. Después de la oclusión unilateral los

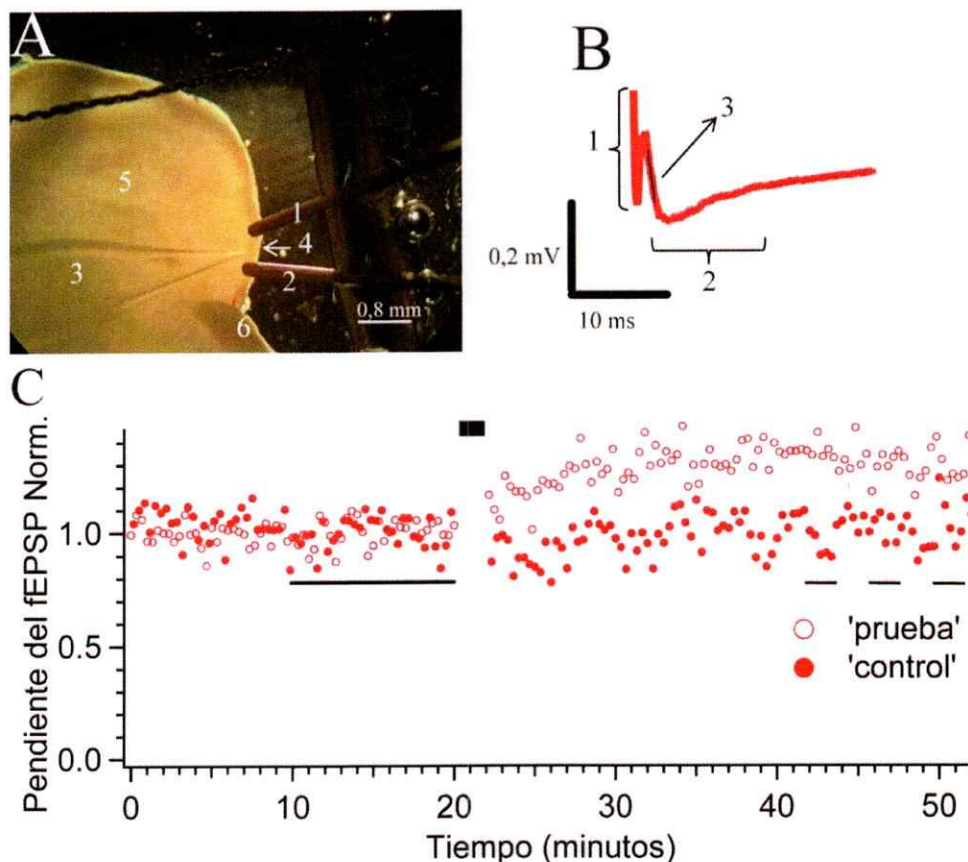
animales fueron trasladados a una incubadora cálida (30-33°C) donde recuperaron su temperatura corporal normal (Phifer y Terry, 1986). Luego fueron devueltos a la madre y se mantuvieron en nuestro vivero junto a ella hasta el destete (20 días) y luego junto a sus pares, hasta que fueron sacrificados para los experimentos a una edad máxima de 34 días.

## RESULTADOS

### *1. Inducción de LTP a durante el primer mes de vida postnatal*

Con el fin de determinar las propiedades plásticas de las sinapsis olfatorias en ACo, se estudió la inducción de LTP por estimulación eléctrica de los axones aferentes en rebanadas de cerebro de rata. Los registros de campo se obtuvieron de rebanadas provenientes de animales de entre 6 días y 34 días postnatal (P6-P34). En la Figura 2A se observa el arreglo experimental para el registro de potenciales de campo en ACo y la Figura 2B muestra un registro típico del potencial de campo evocado por la estimulación de los axones provenientes del tracto olfatorio. Se estimularon dos vías independientes, la vía prueba (Fig. 2C, círculos abiertos), donde se aplicó el protocolo de inducción (Fig. 2C, rectángulo), y la vía control, para evaluar la transmisión basal durante el experimento (Fig. 2C, círculos rojos). La volea presináptica está asociada con la descarga de los axones olfatorios (Fig. 2B, primera inflexión), mientras que el potencial sináptico de campo (también conocido como potencial evocado) es la posterior inflexión del potencial generada por la activación de las corrientes sinápticas en las neuronas de ACo (Fig. 2B, segunda inflexión).

En una primera instancia, se buscó un protocolo de inducción de LTP que aumentara los potenciales postsinápticos de manera reproducible y eficaz a la edad de P18, pues evidencia preliminar del laboratorio mostró que es posible inducir LTP en ACo a esta edad. Este protocolo consistió en una serie de trenes de estímulos de alta frecuencia, denominado *theta burst*



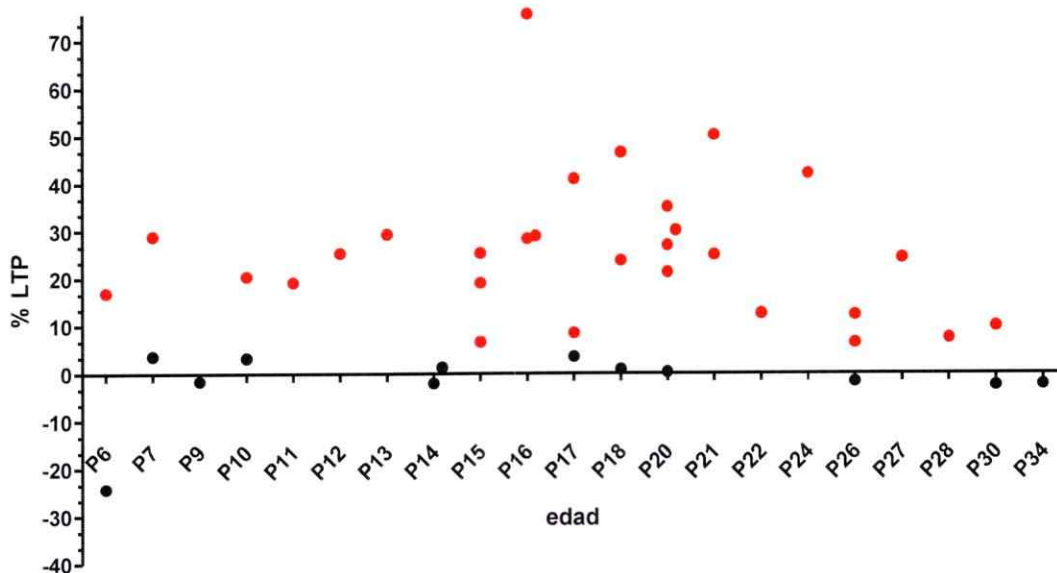
**Figura 2: montaje del registro de rebanadas e inducción de LTP:** **A:** rebanada coronal de cerebro de rata de P25 con electrodos en ACo. Los electrodos de estimulación bipolares (1 y 2) se ubican en la capa I<sub>a</sub>, al igual que el electrodo de registro (3). En el microscopio óptico, la capa I se diferencia del resto de la rebanada como una zona más oscura ubicada en el borde de la rebanada. ACo (flecha, 4), BLA (5), del nervio óptico (6). **B:** potencial de campo inducido en ACo por la estimulación de los axones provenientes del bulbo olfatorio (promedio de 30 registros consecutivos; 10 min). Se observan dos inflexiones en el registro: la volea presináptica (fiber volley en inglés, 1), producto de la descarga presináptica que libera neurotransmisores; y el evocado postsináptico (2), causado por las corrientes que entran a la parte postsináptica por la activación de los receptores de glutamato ionotrópicos. La medida de la pendiente del evocado postsináptico (3) se usa frecuentemente como una medición de la transmisión sináptica dado un cierto nivel de estimulación. **C:** pendiente normalizada en las vías prueba y control (ver texto), durante el experimento de donde procede la señal en B. La línea delgada muestra el intervalo de tiempo donde fueron promediadas las señales para obtener el registro promedio en B, las pendientes son normalizadas con respecto a esta basal. El cuadrado sobre el registro indica el momento en que se aplicó el protocolo de inducción de LTP (TBS). El porcentaje de LTP (%LTP) se calcula con respecto a la vía control, promediando entre 20 y 30 min después de la inducción (línea segmentada al final del registro).

*stimulation* (TBS; ver Métodos). Para asegurar que se estaba evaluando la plasticidad de las vías glutamatérgicas se agregó picrotoxina (PTX), bloqueador de la transmisión GABA-A. Para cuantificar la transmisión sináptica, se midió la pendiente del potencial evocado en el registro de campo (Figura 2B, pendiente de la segunda inflexión). En el experimento ejemplo de la Figura 2, la transmisión sináptica normalizada posterior a la inducción de LTP en la vía prueba fue de  $1,31 \pm 0,01$ , significativamente distinta de la vía control que fue de  $1,00\% \pm 0,02$  ( $P=0,0001$ ; prueba t de Student para datos no pareados), el %LTP con respecto a la vía control fue de  $29,97\% \pm 0,02$ .

Una vez obtenido un protocolo de inducción de LTP exitoso para P18, éste se probó en rebanadas de cerebro de ratas de distintas edades (hasta poco después de terminado el primer mes postnatal). El detalle de los resultados de todos los experimentos separados por edad se muestra en la Figura 3. Cada punto representa el % de cambio obtenido en cada experimento (cada rebanada). Los puntos rojos corresponden a los experimentos con diferencias significativas entre la transmisión de las vías prueba y control después de la inducción.

**Tabla 1:** Para cada rango de edad se presentan los valores de la transmisión sináptica post-inducción de las vías prueba y control, la significancia estadística de la diferencia entre estas vías, y el % de cambio por la inducción de LTP de la vía prueba con respecto a la vía control.

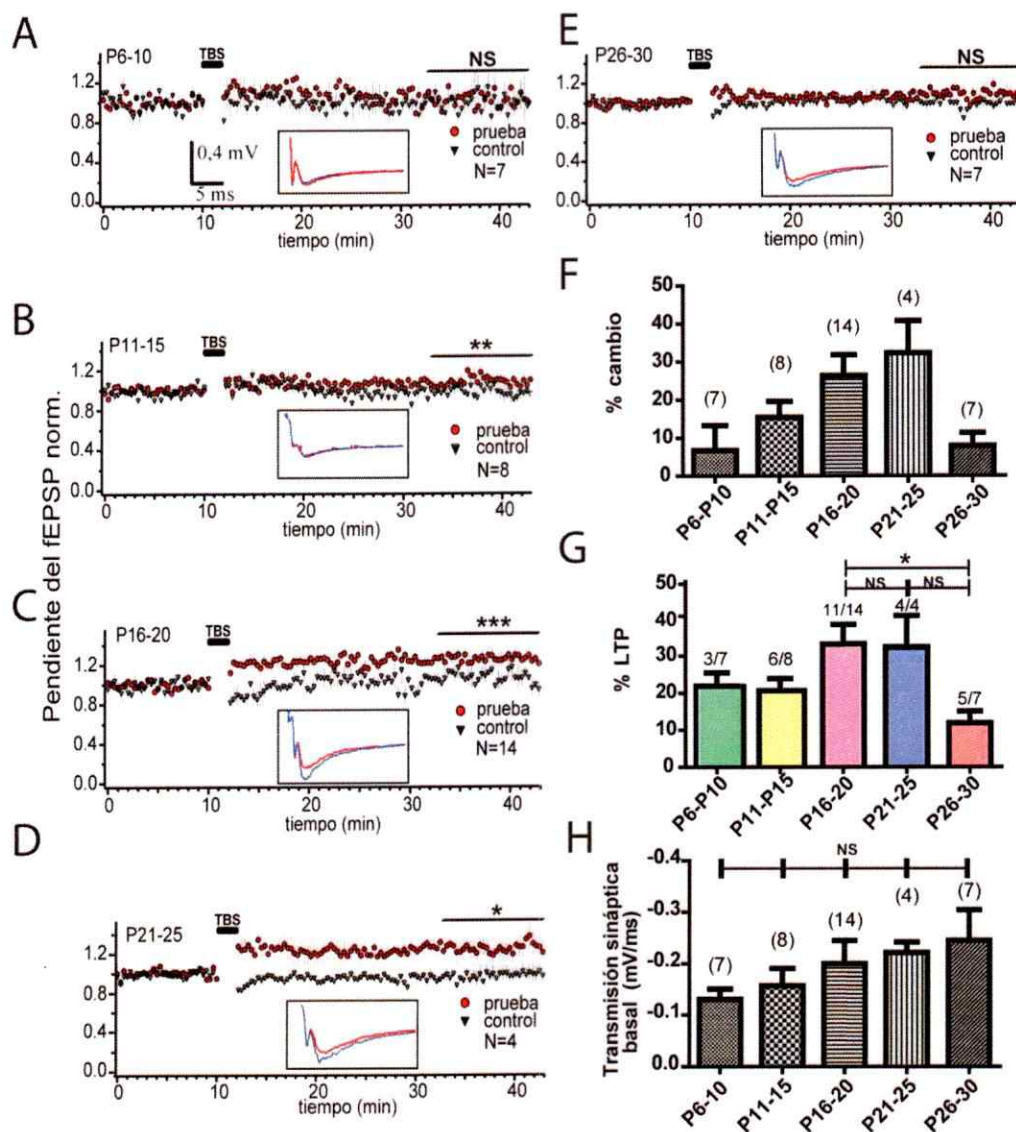
Rango de edad	Transmisión norm. Test	Transmisión norm. Control.	Significancia (P)	% de cambio
P6-10	$1,06 \pm 0,05$	$1,01 \pm 0,07$	0,5285	$6,70 \pm 6,6$
P11-15	$1,08 \pm 0,04$	$0,94 \pm 0,04$	0,009	$15,40 \pm 4,2$
P16-20	$1,26 \pm 0,05$	$1,01 \pm 0,03$	0,0002	$26,36 \pm 5,41$
P21-25	$1,28 \pm 0,10$	$0,97 \pm 0,05$	0,033	$32,28 \pm 8,46$
P26-30	$1,07 \pm 0,05$	$1,00 \pm 0,05$	0,055	$6,60 \pm 3,22$



**Figura 3: porcentaje de LTP inducida a lo largo del primer mes de vida postnatal.** Cada punto corresponde al porcentaje de LTP (respecto de la vía control) inducido en rebanadas obtenidas de animales de diferentes edades (entre P6 y P34; N= 41). Los círculos rojos representan los experimentos en donde hubo una potenciación significativa con respecto al control y los círculos negros son los experimentos en donde no hubo diferencia significativa

A continuación, para tener una cuantificación más clara de los resultados, éstos fueron agrupados cada 5 o 10 días, con el fin de realizar comparaciones estadísticas entre distintos rangos de edad y determinar si existe un periodo crítico en el que la inducción de LTP se vea favorecida. Los promedios de los experimentos realizados, agrupados cada 5 días, se muestran en la Figura 4A-D, donde cada recuadro corresponde a un registro representativo para ese rango de edad. Entre P6 y P10 (P6-10) el protocolo de inducción de LTP no produce, en promedio, un aumento significativo en la transmisión sináptica (Fig. 4A y tabla I; prueba t de Student de datos pareados  $P=0,5285$ ). En P11-15 se observó un aumento significativo de la transmisión después del TBS (Fig. 4B y Tabla I; prueba t de Student para datos pareados  $P=0,009$ ).





**Figura 4: el grado de potenciación depende de la edad postnatal.** A-E: promedio de los experimentos de LTP en distintos rangos de edad (cada 5 días). El inserto en cada panel corresponde al promedio de 30 registros consecutivos (10 min) de un experimento representativo para cada rango de edad; rojo: basal, azul: promedio a 20-30 minutos después de la inducción; calibración: 0,4 mV, 5 ms. F: % de cambio promedio en cada rango de edad. H: %LTP promedio considerando sólo los experimentos exitosos en la inducción de potenciación (ver texto). G: nivel de transmisión sináptica basal promedio a la que se aplicó el TBS (pendiente del fEPSP, 60% de la respuesta máxima) en cada rango de edad. A-E: prueba t de Student para datos pareados, F-H: prueba de Kruskal Wallis. NS: no significativo; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .

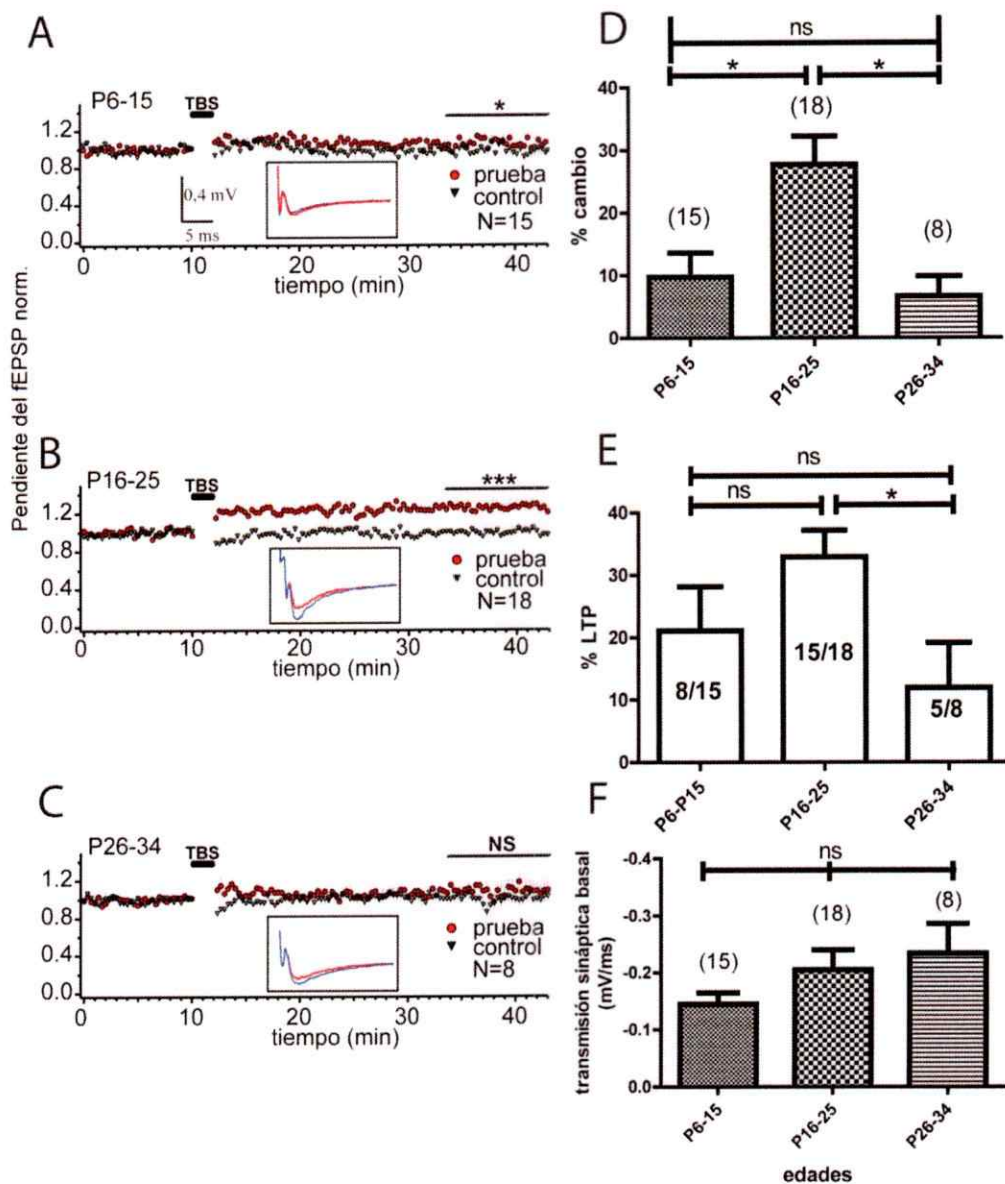
Interesantemente para los rangos de edad de P16-20 y P21-25, la inducción de potenciación es más robusta (P16-20: fig.4C y Tabla I; prueba t de Student para datos pareados  $P=0,0002$ ; P21-25: fig.4D y Tabla I, prueba t de Student para datos pareados  $P=0,033$ ). Sin embargo, en edades más tardías (P26-30) se produce un cambio importante en la inducción de potenciación, pues si bien en algunos experimentos se observa potenciación sináptica, en promedio no hay LTP (Figura 4E y Tabla I, prueba de t Student para datos pareados  $P=0,055$ ), a diferencia de los rango de edad P16-20y P21-25 (Figura 4C y D). En la Fig. 4F se muestra un resumen de los % de cambio promedio inducidos en los distintos rangos de edad. Aunque se observa un aumento en el % de cambio de la transmisión a edades tempranas, y una posterior disminución a edades más tardías (Fig. 4F y Tabla I;  $P=0,031$  prueba de Kruskal-Wallis), no fue posible sustentar estadísticamente las diferencias, pues la prueba de la varianza no paramétrica mostró una diferencia significativa entre los % de cambio de los rangos de edad ( $P=0,031$ ), pero la prueba *post hoc* de múltiple comparación de Dunns no detectó entre cuáles rangos de edad estaba esa diferencia. Una posible explicación puede ser que cantidad de datos obtenidos en algunos grupos fueron insuficientes para evaluar su distribución y aplicar la prueba estadística paramétrica. Sin embargo, se puede afirmar con este análisis que hay un periodo crítico en el primer mes de desarrollo postnatal, puesto que detecta una diferencia entre los rango de edad. Faltaría determinar cuál es el rango de edad donde está este periodo crítico de inducción. Sobre este punto volveremos más adelante.

El periodo crítico de la inducción de LTP visto anteriormente puede estar sustentado en un aumento del nivel de LTP inducido en algún rango de edad, en un aumento de la probabilidad de inducción de LTP o en el aumento en la transmisión sináptica basal. Una diferencia de estos parámetros entre los rangos de edad puede dar cuenta del periodo crítico de inducción. Para posibles diferencias en estos parámetros, se cuantificó el nivel de inducción de LTP promedio



por rango de edad, promediando sólo los experimentos en donde hubo LTP significativa en cada rango (Fig. 4G). Los niveles de LTP que se logran en los casos exitosos es de aproximadamente el 20% en edades de P6-10 y P11-15 (Fig. 4G, P6 -10:  $22,0 \pm 3,6\%$ ; P11-15:  $20,7 \pm 3,3\%$ ). Entre P16 y P25, el porcentaje de LTP alcanzado en estos casos es del orden del 30% (Fig. 4G, P16-20:  $33,1 \pm 5,2\%$ ; P21-25:  $32,3 \pm 8,5\%$ ). Para las edades tardías, el promedio de la potenciación inducida alcanza un 11% (Fig. 4G, P26-34:  $11,89 \pm 3,23\%$ ). Los promedios de %LTP entre los rangos P16-20 y P26-30 fueron significativos (prueba de Kruskal Wallis  $P=0,033$ ). Por otro lado, la probabilidad de inducción de LTP, en los rangos de P16-20 y P21-25 fue más alta (Fig.4G 11/14 y 4/4 respectivamente) que en los rangos de edad más tempranos y más tardíos (Fig.4G: P6-10, 3/7; P11-15, 6/8; P26-30, 5/7). Estos datos sugieren que tanto el %LTP por rango de edad, como la probabilidad de inducción pueden influir en las diferencias del % de cambio observado por rango de edad.

Posiblemente, si existen diferencias en la transmisión sináptica entre los rangos de edades, pueden explicar en parte la diferencia en el % de cambio de la transmisión. Por ello se evaluó si hay diferencias en la transmisión sináptica basal, cuantificando ésta última la vía en donde se indujo LTP, en cada experimento, midiendo la pendiente del potencial postsináptico para la intensidad de estimulación que produce el 60% de la respuesta máxima, que corresponde a la condición en que se indujo LTP. Los valores promedio por rango de edad se resumen en el gráfico de la Figura 4H. En P6-10, la pendiente de la transmisión basal fue en promedio de  $-0,13 \pm 0,02$  mV/ms. Aunque su magnitud en promedio aumenta en edades posteriores (Fig. 4H, P11-15:  $-0,16 \pm 0,03$  mV/ms; P16-20:  $-0,20 \pm 0,05$ ; P21-25:  $-0,22$  mV/ms  $\pm 0,02$ ), hasta llegar a un



**Figura 5: durante el primer mes el grado de potenciación primero aumenta y posteriormente vuelve a caer: evidencia de un período crítico para la LTP. A-C:** lo mismo que en la Fig. 4, pero para una agrupación de los resultados en rangos de edad de 10 días. Calibración: 0,4 mV, 5 ms. **D:** % de cambio promedio por rango de edad. **H:** %LTP promedio considerando sólo los experimentos exitosos (se indica fracción de éxitos respecto del total de experimentos por rango etario). **G:** nivel de transmisión sináptica basal promedio a la que se aplicó el TBS en cada rango de edad. A-C: prueba t de Student para datos pareados, D-F: ANOVA de una vía además de la prueba *post hoc* de Bonferroni en D y E. NS: no significativo; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .

valor promedio de  $-0,23 \text{ mV/ms} \pm 0,053$  en edades más tardías (Fig. 4H, P26-30) no hay diferencias significativas en la transmisión basal promedio por rango de edad ( $P=0,20$ ; prueba de Kruskal-Wallis). Esto sugiere que las diferencias vistas en el % de cambio post-inducción por rango de edad no es producto de una variación de la transmisión sináptica total.

Las diferencias vistas en el % de cambio por la inducción de potenciación sugiere que si existe un periodo crítico de la inducción de LTP, es decir, una ventana temporal dentro del desarrollo postnatal, en el cual es posible inducir LTP, o el nivel de plasticidad inducida es mayor, que a otra edad del desarrollo postnatal. Si la prueba estadística detectó diferencias entre los % de cambio de los rangos de edades, pero no determinó en cuáles específicamente, pudo ser producto de la baja cantidad de datos en algunos rangos de edades. Para comprobar si era posible verificar estadísticamente cuando se contaba con un número mayor de observaciones, se hizo una reagrupación de los datos cada 10 días. Los resultados de esta nueva reagrupación se presentan en la Figura 5. Para el rango de edad de P6-15, hay una diferencia significativa entre la vía prueba y la vía control (Fig. 5A transmisión sináptica normalizada post-inducción vía prueba:  $1,07 \pm 0,03$ ; vía control  $0,97 \pm 0,04$ ; prueba t de Student para datos pareados,  $P=0,03$ ) como también en el rango de edad siguiente (P16-25, Fig. 5B, vía prueba:  $1,26 \pm 0,05$ ; vía control:  $1,00 \pm 0,02$ ; prueba t de Student para datos pareados,  $p<0,0001$ ). A edades tardías, en promedio no hay un aumento significativo de la transmisión sináptica (Fig. 5C, P26-34, vía prueba:  $1,07 \pm 0,048$ ; vía control:  $1,00 \pm 0,05$ ; prueba t de Student para datos pareados). Este análisis estadístico corrobora lo que se observó en la primera agrupación, que hay un periodo crítico en la inducción de potenciación, donde hay un aumento significativo de la transmisión sináptica por la inducción de LTP a edades tempranas (P6-15 y P16-25), pero no ha edades tardías (P26-34).

Esta diferencia en la inducción de potenciación por rango de edad se puede observar con el % de cambio alcanzado por rango de edad, los cuales se muestran en la Figura 5D. Se observa que el % de cambio correspondiente a edades intermedias (Fig. 5D; P16-25: % de cambio:  $27,7 \pm 4,5\%$ ,  $N=15/18$ ) es mayor que a edades tempranas (Fig. 5D; P6-15: % de cambio=  $11,3 \pm 3,8\%$ ,  $N=8/15$ ) y edades tardías (Fig. 5D; P26-34, % de cambio= $6,6 \pm 3,2\%$ ). Interesantemente, existen diferencias significativas en el % de cambio inducida entre las edades de P6-15 y P16-25, y entre P16-25 y P26-34, Sin embargo, los rangos de edades P6-15 y P26-34 no muestran diferencias significativas (ANOVA de una vía,  $P<0,004$ , prueba *post hoc* de Bonferroni). Esto muestra que existe un periodo crítico en las sinapsis aferentes de ACo, que comienza en edades tempranas (P6-15), y dentro del cual el nivel de inducción de LTP, en promedio, es significativamente mayor que otras edades, dentro del primer mes del desarrollo postnatal.

Analizando el %LTP por rango de edad, promediando el % de cambio sólo de los experimentos exitosos (Fig. 5E), se obtiene que a P6-P15 el nivel de potenciación promedio inducido es de un  $21,1 \pm 2,4\%$ , mientras que en el rango de P16-25 es de  $32,9 \pm 4,3\%$ . En edades posteriores (P26-34), el porcentaje de la LTP lograda es de un  $11,9 \pm 3,3\%$  (Fig. 5E), siendo significativamente más bajo que el porcentaje de LTP alcanzada en el rango P16-25 ( $P= 0,009$ , ANOVA de una vía, prueba *post hoc* Bonferroni), aunque sin diferencias con respecto al rango de P26-34 ( $P>0,05$ ). También se puede observar que la proporción de experimentos exitosos, es decir aquellos en donde se induce una LTP significativa con respecto al control, aumenta en el grupo donde la LTP inducida es mayor (Fig. 5B y E). Este análisis muestra que hay una mayor tasa de éxito en la inducción de LTP en edades de P16-25 y que además, la inducción es mayor

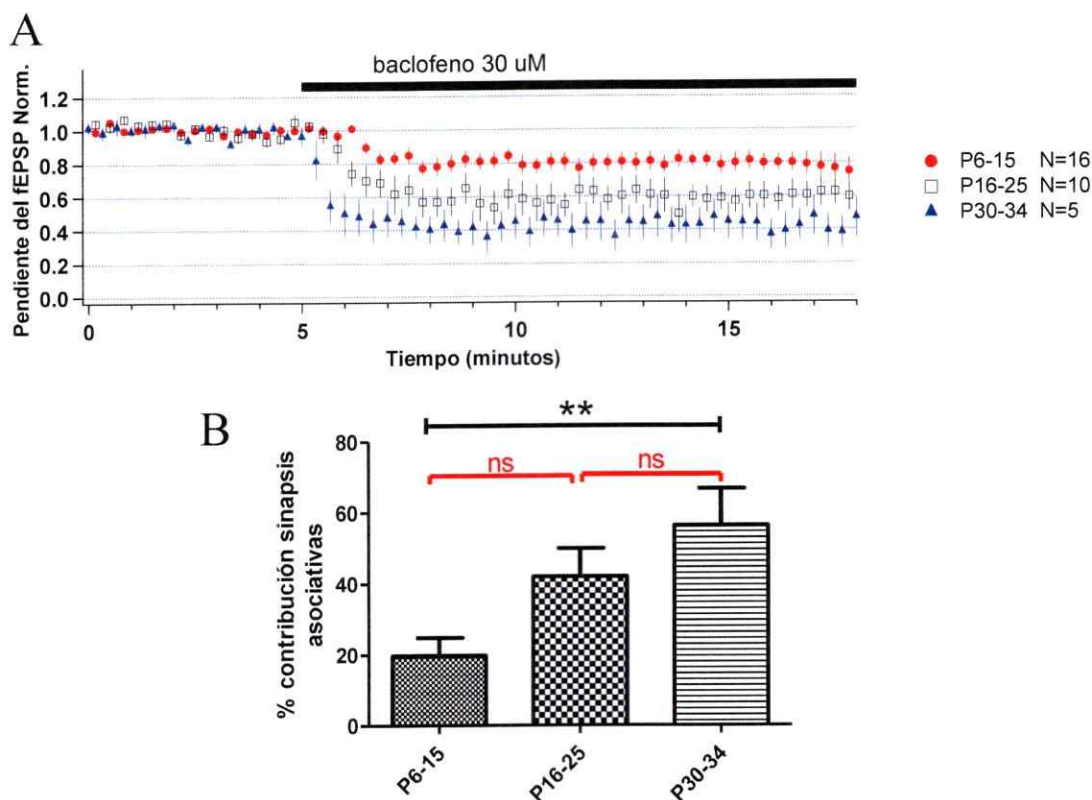
en los casos exitosos. Entre P26 y 35 disminuye tanto la proporción de éxitos como el nivel de potenciación obtenido (Fig. 5C y E).

Bajo el mismo procedimiento que en la medición de la transmisión sináptica basal en los rango de edad de 5 días, se estimó el promedio de la transmisión sináptica basal en rangos de 10 días (Fig. 5F). Las diferencias de la transmisión sináptica entre edades no son significativas (Fig. 5F, P6-15, transmisión sináptica:  $-0,14 \pm 0,020$  mV/ms, N=15; P16-25:  $-0,20 \pm 0,035$  mV/ms, N=18; P26-34:  $-0,23 \pm 0,053$  mV/ms, N=8; ANOVA de una vía, P=0,2). En el rango de P26-34 se observan niveles similares al grupo etario anterior (P16-25), a diferencia de lo que ocurre con la inducción de plasticidad (Fig. 5D). Estos análisis sugieren fuertemente que este último fenómeno no es producto de cambios en los niveles de transmisión sináptica basal.

## *2.- Contribución de las distintas vías sinápticas a los potenciales evocados en ACo.*

Dado que el cerebro (y la mayoría de los órganos en general), terminan su desarrollo al alcanzar la etapa adulta, el aspecto de la rebanada cambia durante el primer mes de desarrollo postnatal según la edad del animal. En corteza piriforme se ha visto que las capas que componen a esta corteza se ven definidas en P7, así como la presencia de interneuronas en cada capa cambia desde P2 hasta estabilizarse en P7-14 (Sarma y cols., 2011). Por lo tanto, es razonable pensar que en ACo la disposición y grosor de las capas cambien con la edad. Sin embargo, no hay suficiente información acerca del desarrollo y ubicación de las capas de ACo durante el primer mes de postnatal, por lo que, para verificar en qué medida se están estimulando solamente los axones provenientes del TOL, se decidió medir la posible contribución de las sinapsis asociativas a los potenciales postsinápticos de campo. Para ello se midieron los

potenciales de campo con la misma ubicación de los electrodos que en los experimentos de plasticidad, pero en presencia de baclofeno (30  $\mu$ M, ver Métodos), agonista de los receptores GABA B que suprime la transmisión sináptica de fibras intracorticales (o asociativas) en la corteza piriforme e hipocampo y en neocorteza, pero no afecta a las sinapsis aferentes (Tang y Hasselmo, 1994; Gil y cols., 1997). Los resultados se grafican en la Figura 6, donde se muestra la pendiente normalizada del potencial postsináptico antes y después de agregar baclofeno en el LCRA circulante. La caída de la transmisión evocada corresponde a la contribución de las sinapsis asociativas suprimidas por baclofeno. A edades tempranas (P6-15), el potencial postsináptico cae un  $19,8 \pm 5,1\%$ , por lo que se estima la contribución de las sinapsis asociativas en ese porcentaje (Fig. 6A, círculos; 6B, P6-15). A edades intermedias llega a ser de  $42,1 \pm 8,0\%$  (Fig. 6A, cuadrados; 6B, P16-25) Por último, a edades tardías hay una contribución de hasta un  $56,3 \pm 10\%$  de las sinapsis asociativas (6A, triángulos; 6B, P30-34), lo que sugiere que en nuestra preparación experimental hay una contribución de sinapsis asociativas en los potenciales postsinápticos registrados que aumenta con la edad (prueba de Kruskal Wallis con prueba *post hoc* de múltiple comparación de Dunn;  $P=0,001$ ), y no se puede asegurar que la LTP inducida corresponda exclusivamente a la estimulación de sinapsis del TOL. No hay antecedentes acerca de las propiedades plásticas de la transmisión de las sinapsis asociativas de ACo, pero si tuvieran las mismas propiedades que las sinapsis asociativas de CP, su contribución a P26-34 mantendría una inducción de potenciación a esa edad. Como la contribución de las sinapsis asociativas no va en el mismo sentido que el cambio en la inducción de potenciación, se puede descartar que las sinapsis asociativas expliquen el periodo crítico observado. Por otro lado, el hecho de estimular la capa I<sub>a</sub> y encontrar contribución de sinapsis asociativas nos da a entender que las sinapsis en las capas de ACo no están totalmente segregadas como en otras cortezas.



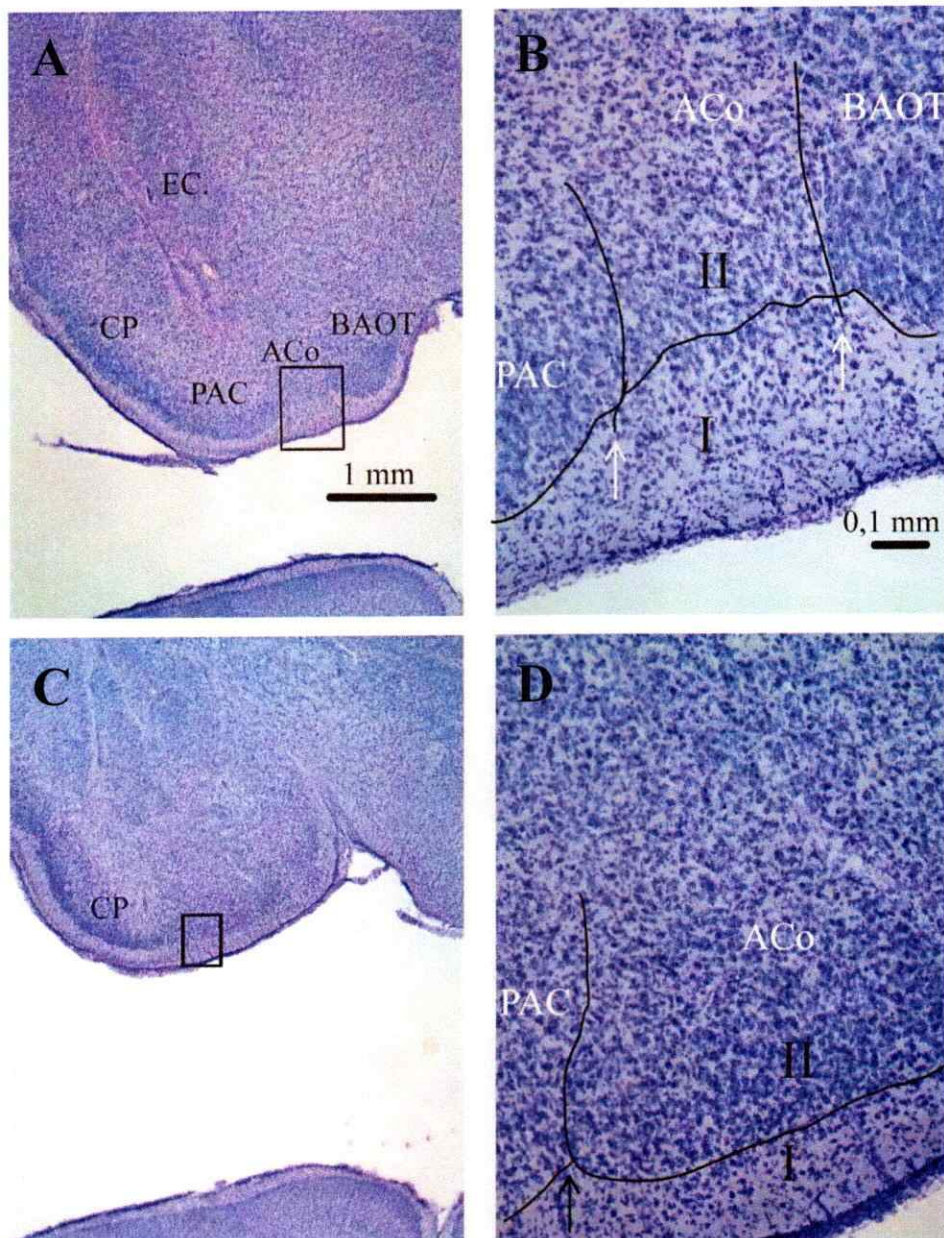
**Figura 6: la contribución de las sinapsis asociativas al estimular la capa I<sub>a</sub> aumenta con la edad. A:** transmisión sináptica normalizada, antes y durante la aplicación de baclofeno (30 $\mu$ M), para los distintos rangos de edad. Estos experimentos se realizaron en condiciones similares a los experimentos de plasticidad (estimulación que produce un 60% de la respuesta máxima). En presencia de baclofeno, la transmisión sináptica decae, efecto que aumenta con la edad. **B:** contribución porcentual de las sinapsis asociativas a la transmisión sináptica, a través del primer mes de vida, estimada a partir del efecto de baclofeno mostrado en **A**. Se observa que la contribución de estas sinapsis aumenta con la edad, y llega a ser significativamente mayor en edades más tardías (P30-34; \*\*:  $p < 0,01$ ; prueba de Kruskal Wallis con prueba *post hoc* de múltiple comparación de Dunn).

En general, la estimación de la capa I<sub>a</sub>, se determinó en todos los experimentos a lupa como la capa parte más externa de la rebanada, que se aprecia como la capa más oscura en la Figura 2A, y como se han determinado en otros estudios en ratas adultas, es allí donde llegan los axones provenientes del BO (Price, 1973); en ratas neonatas o juveniles, no se ha realizado un estudio similar. Por otro lado, por ser cortezas olfatorias, ACo siempre es comparada con CP, donde esta última tiene una segregación de sus sinapsis aferentes y asociativas, pero en ACo no

se ha corroborado que sea así a esta edad. Para verificar una posible contribución de las sinapsis asociativas por estimulación de la capa I<sub>a</sub>, se realizaron tinciones en rebanadas de cerebro de rata de 2 edades, P11 y P20, para ubicar las distintas capas de la corteza olfatoria. La Figura 7 muestra una tinción de Nissl en 2 rebanadas de cerebro de rata a P11. En ellas se pueden distinguir claramente las dos capas por la diferencia en la densidad celular: la capa I es aquella que tiene menos cantidad de células y la capa II es aquella que tiene la mayor densidad celular. También se pueden diferenciar las distintas regiones corticales por la distribución espacial de las células teñidas: en corteza piriforme (Fig. 7, A y C, CP) se ve como las células en la capa II están ordenadas formando una capa densa. En ACo (Fig. 7, B y D, ACo) la disposición de las células es más dispersa, aunque conserva la capa I carente de células. La diferencia en la distribución espacial de las células en ACo es la razón por la que la clasificaron como “núcleo tipo corteza” (Sah y cols., 2003).

Por otro lado, la tinción de Nissl sólo permite diferenciar cuerpos celulares, y si bien da una sugerencia de donde se ubican las fibras provenientes del bulbo olfatorio, no da una certeza de su posición. Debido a esto, se decidió marcar también las fibras olfatorias mediante el trazador anterógrado biotina, y revelarlo con DAB para comprobar si la estimación que se hizo



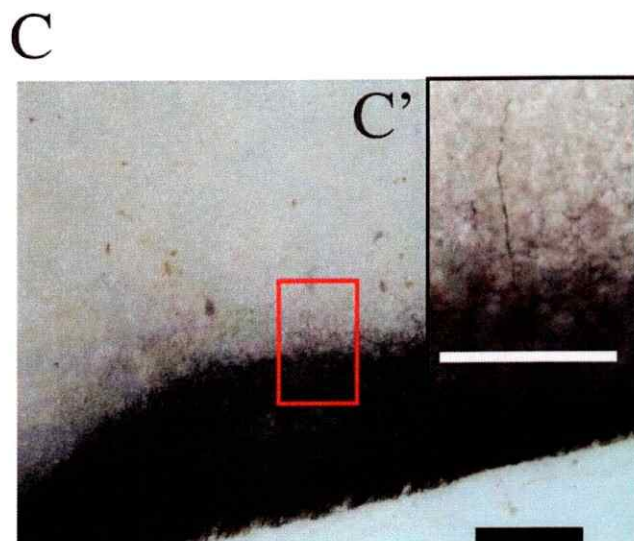
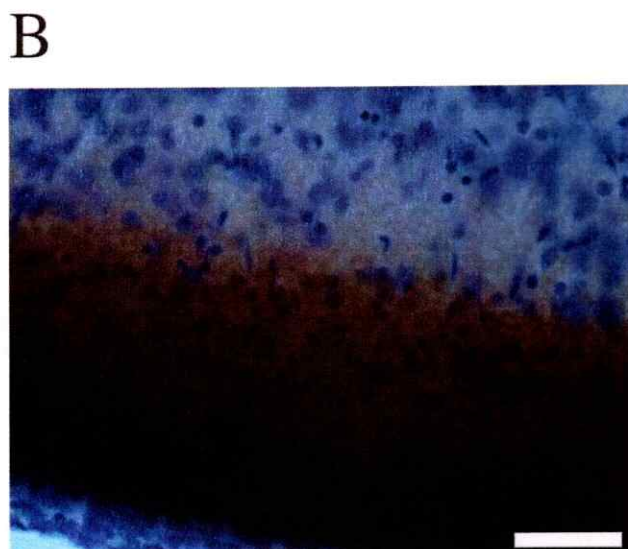
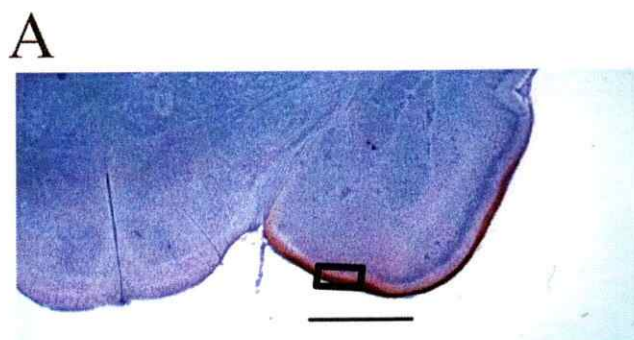


**Figura 7: tinción de Nissl de rebanadas de cerebro de rata a P11.** En las rebanadas (A y C) se distingue la capa I (pocos cuerpos celulares) de la capa II (mayor densidad de cuerpos celulares). **A:** rebanada anterior, donde se observa ACo entre los núcleos PAC y BAOT. **B:** acercamiento del sector enmarcado con el rectángulo en A. Límites del núcleo ACo señalados con flechas blancas. **C:** rebanada posterior a A, se distingue CP, BLA, PAC, BAOT y ACo entre los dos últimos núcleos. **D:** detalle del sector enmarcado con un rectángulo en C. Se ven las dos capas (I y II) y se indica el límite de los núcleos PAC y ACo (flecha negra).

de la capa I<sub>a</sub> es la correcta. Con una modificación del método de Chang y cols. (2000), se marcó el tracto olfatorio con un cristal de biocitina *in vitro* en un cerebro de rata a P20, para luego ser contrateñido con Nissl. Eso da como resultado un marcaje de los cuerpos celulares así como de los axones del TOL. El resultado de este experimento se muestra en la Figura 8. Se observa como los axones del TOL están en la capa I<sub>a</sub>. Esta capa se encuentra en todos los blancos conocidos de las fibras olfatorias, CP y PAC (Fig 8A), la capa I<sub>a</sub> de la corteza piriforme es más delgada que la capa I<sub>a</sub> de ACo, a ese nivel del eje antero-posterior. En el límite de las capas I y II se distinguen algunas fibras que ingresan a las capas más profundas (Fig. 8C, flecha). Estos resultados, si bien no es un estudio sistemático de la disposición de las fibras del TOL a través del primer mes de vida de la rata, nos sugieren que la estimación de la capa I<sub>a</sub> por la visualización a través de la lupa del microscopio óptico es la correcta, y de la disposición de las fibras del TOL en las capas de la corteza olfatoria. Esta prueba no asegura que las sinapsis aferentes de ACo se encuentren en el mismo lugar por donde se internan las fibras del TOL a la corteza, pero trabajos anteriores han revelado que se ubican en esta capa (Price, 1973).

### *3.- Evaluación de las posibles modificaciones en la transmisión sináptica basal por la deprivación olfatoria*

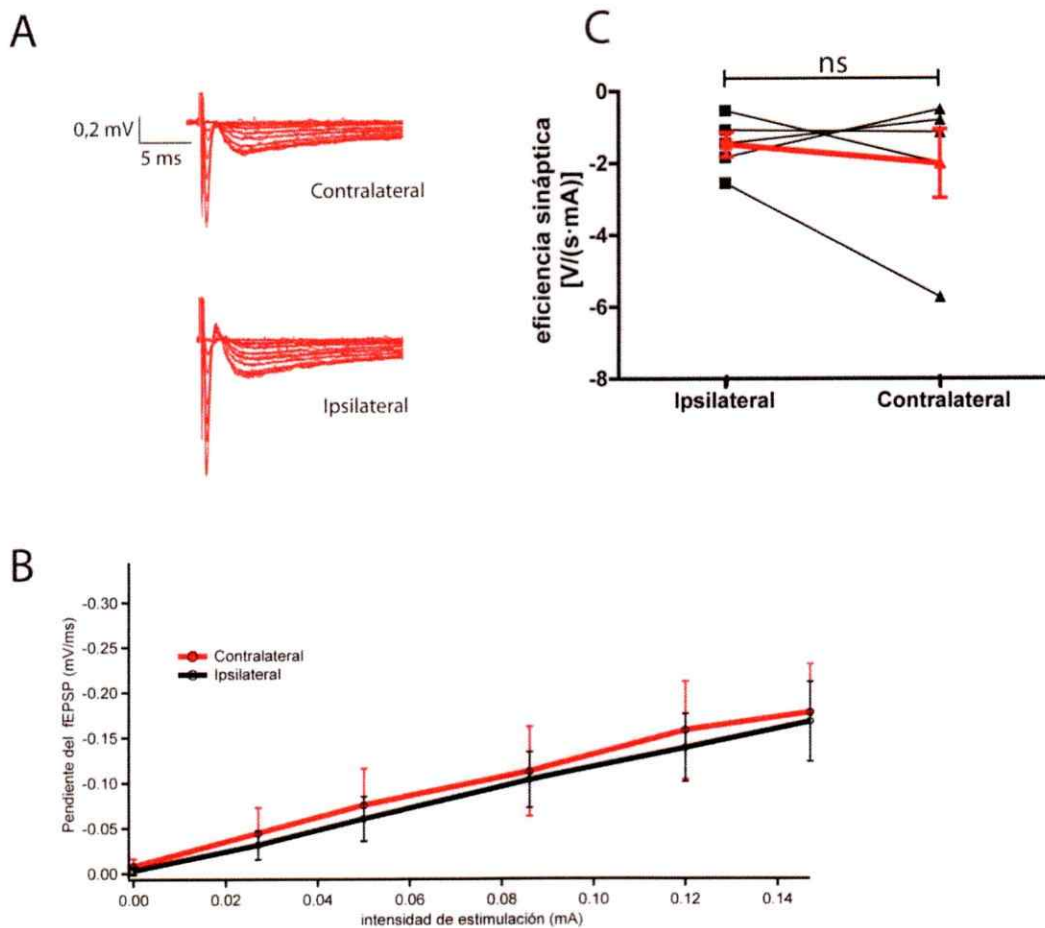
Dado que la organización del sistema olfatorio y los axones que provienen del bulbo es esencialmente ipsilateral, cualquier perturbación que se produzca en un lado de este sistema sensorial, no afectará a las estructuras olfativas del otro lado. Esto es una gran ventaja para estimar los efectos la deprivación sensorial en cualquier parte del sistema olfatorio. Para ello, se



**Figura 8: marcaje de vías aferentes y cuerpos celulares.** Se muestra la difusión de biocitina revelada con DAB y posterior contratinción con nissl. **A:** rebanada coronal de cerebro de rata a P20 de 80  $\mu\text{m}$  de grosor; en morado se observan los cuerpos celulares y en café la capa I<sub>a</sub>, donde corren los axones del TOL. **B:** detalle de la sección del rectángulo en A, se ve el conjunto de fibras del TOL en la parte superficial de la rebanada. **C:** rebanada contralateral a A, pero sin contratinción, se puede observar las fibras que ingresan al interior de la capa II (recuadro rojo). **C':** ampliación del recuadro rojo en C, donde se distingue una proyección del TOL hacia la capa II (calibración: A: 1mm, B: 50  $\mu\text{m}$ , C: 100 $\mu\text{m}$ , C': 50  $\mu\text{m}$ ).

cauterizó la narina de un hemisferio en ratas de P1-4, y se evaluó la transmisión basal en las sinapsis olfatorias de ACo en rebanadas de cerebro de rata de P18-25, que es el rango de edad del desarrollo postnatal que mostraba una LTP más robusta. Las curvas entrada/salida relacionan, a diferentes intensidades de estimulación, las distintas amplitudes del elemento presináptico del potencial de campo, con la pendiente de su respectivo evocado, señal de la transmisión postsináptica. También es utilizado comparar la intensidad de estimulación con el evocado postsináptico. Debido a que la cuantificación de la volemia presináptica se dificultó por la diferencia entre un registro y otro, se optó por construir las curvas entrada/salida relacionando la intensidad de estimulación con la pendiente del evocado postsináptico. En la Figura 9A se observa una muestra de los registros de potencial de campo observado a distintas intensidades de estimulación, tanto para la rebanada proveniente del hemisferio contralateral a la deprivación (contralateral) (Fig. 9A izquierda, arriba) como del ipsilateral a la deprivación (Fig. 9A izquierda, abajo). Las curvas entrada/salida promedio para las rebanadas provenientes de contra e ipsilaterales están graficadas en la Figura 9B, donde no se observan diferencias significativas en la pendiente o el intercepto de estas curvas (regresión lineal y ANCOVA: comparación pendiente  $P=0,7$ ; comparación intercepto eje Y  $P=0,43$ ). La pendiente de cada una de las curvas entrada/salida, proporciona una medida relativa de la eficiencia sináptica. Se comparó la eficiencia registrada en las rebanadas del hemisferio ipsi y contralateral en cada animal, en promedio no mostraron diferencias entre las dos condiciones investigadas (Fig. 9C,  $P=0,3$  prueba t de Student para datos pareados; promedio hemisferio ipsilateral:  $-1,49 \pm 0,34$  [V/(s·mA)]; promedio hemisferio contralateral:  $-2,04 \pm 0,95$  [V/(s·mA)];  $N=5$ ). Por lo tanto, según estos resultados la ausencia de experiencia sensorial olfatoria no afecta a la transmisión sináptica basal en las sinapsis olfatorias de ACo en el rango de edad en que la potenciación sináptica es máxima.



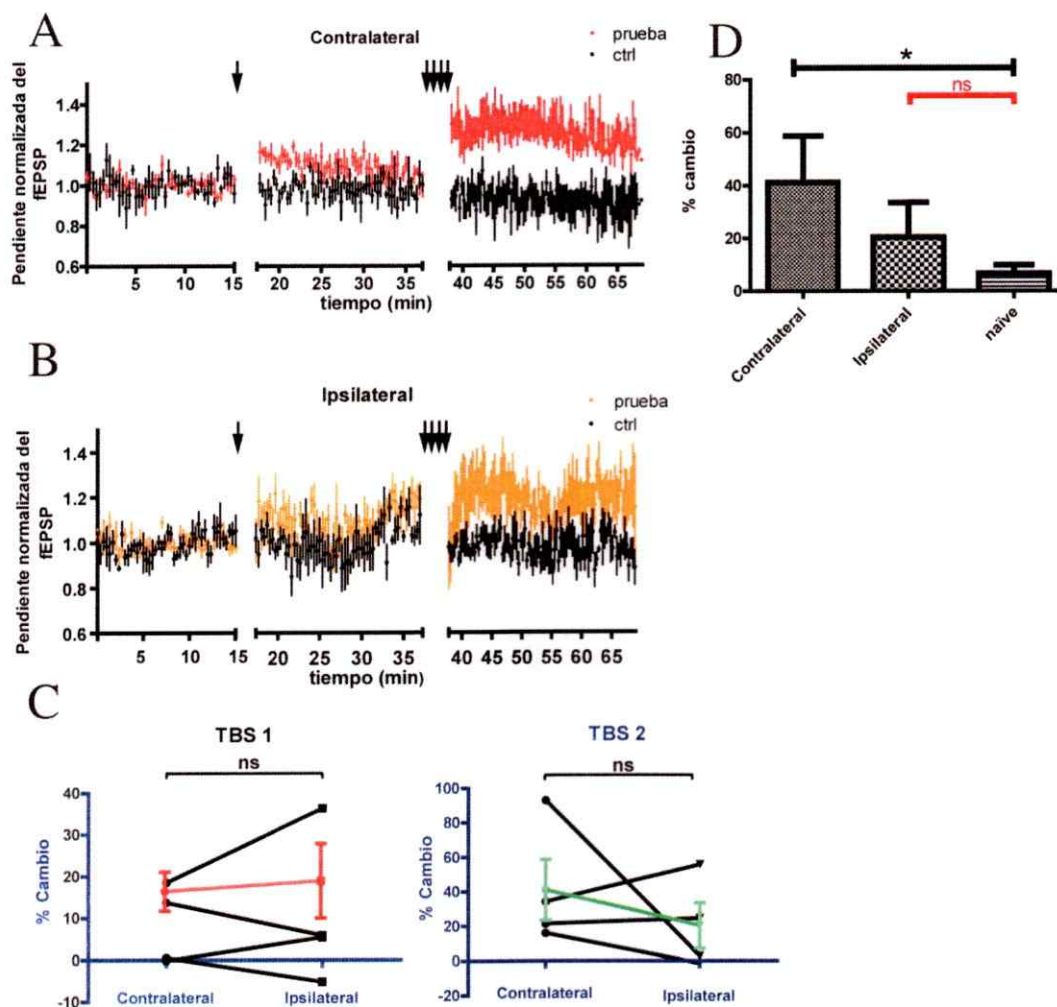


**Figura 9: la privación olfativa temprana no afecta la transmisión sináptica basal a P21-25.** **A:** registros superpuestos del potencial de campo evocado por la estimulación eléctrica a distintas intensidades, en rebanadas provenientes del hemisferio contralateral (arriba) e ipsilateral (abajo), respectivamente. **B:** curvas entrada-salida promedio: pendiente del fEPSP (mV/ms) en función de la intensidad de estimulación, para las rebanadas provenientes de los hemisferios ipsilaterales (trazo negro, N=5) y contralaterales (trazo rojo, N=5) no hay diferencia estadística entre las curvas (regresión lineal y ANCOVA; comparación de la pendiente,  $P=0,7$ ; comparación del intercepto eje Y,  $P=0,4$ ). **C:** comparación pareada de la eficiencia sináptica (definida como (pendiente fEPSP)/(intensidad de estimulación)), entre los hemisferios ipsilateral y contralateral (N=5). Los símbolos negros corresponden a cada dato que tiene su correspondiente par en cada condición unido con una línea, los símbolos rojos corresponden a los promedios de cada condición (ns: no significativo; prueba t de Student para datos pareados,  $P=0,3$ )

#### *4.-Evaluación de los efectos de la privación olfatoria sobre la inducción de plasticidad.*

Para determinar si la privación olfatoria afecta a la duración del periodo crítico encontrado dentro del primer mes postnatal, se probó si la privación olfatoria altera la potenciación inducida en el rango de edad de P25 a P34. Existe evidencia que en otros sistemas sensoriales la experiencia es esencial para formación y maduración de las sinapsis, la privación sensorial conlleva una alteración en las sinapsis y en las propiedades de éstas, como la plasticidad (Kirwood y cols., 1995, Hensch, 2005). Para probar este punto en las sinapsis aferentes de ACo, se evaluó la inducción de LTP *in vitro* en rebanadas de cerebro de ratas que fueron privadas por cauterización a edades de P1-P4, y registradas a P24-35. Tomando el protocolo modificado de Franks e Isaacson (2005), se utilizaron dos protocolos de estimulación: uno denominado “débil”, y posteriormente otro denominado “fuerte”. La diferencia entre estos dos protocolos es la cantidad de trenes de *bursts* que son aplicados durante la inducción de potenciación, de manera que el protocolo “débil” no es saturante, mientras que el “fuerte” es saturante, permitiendo denotar diferencias en el umbral de inducción de potenciación (ver Métodos). Esta modificación fue utilizada en Franks e Isaacson (2005) y ellos encontraron que la privación modificó el umbral de inducción de LTP, pero no el nivel máximo de LTP alcanzado.

En experimentos exploratorios en ACo, donde se indujo LTP en rebanadas del hemisferio contra e ipsilateral a la privación con el protocolo estándar, no se observaron diferencias evidentes en los niveles de LTP alcanzado entre las dos condiciones (no se muestra). Por lo tanto, se decidió modificar el experimento de potenciación aplicando secuencialmente estos dos protocolos de inducción con el fin de observar si había alguna diferencia en el umbral de inducción de la potenciación. Los resultados de estos experimentos, realizados en rebanadas



**Figura 10: efecto de la privación sensorial en la inducción de potenciación hacia fines del primer mes.** **A:** gráfico promedio de los experimentos de plasticidad en rebanadas provenientes de hemisferios contralaterales a la privación (N=4 rebanadas, de 4 animales sometidos a privación de la nariz). La primera flecha arriba del gráfico marca el tiempo de la aplicación del protocolo débil (TBS1). El grupo de flechas corresponde a la aplicación del protocolo fuerte (TBS2) 20 min después. **B:** lo mismo que en A, para los hemisferios ipsilaterales a la privación de los mismos animales. **C:** comparación pareada del porcentaje de cambio obtenido por la aplicación de TBS1 (protocolo débil, no saturante) y TBS2 (protocolo fuerte, saturante), para hemisferios ipsilaterales y contralaterales (N=4) de los mismos animales. **D:** gráfico del % cambio obtenido en rebanadas que proceden de hemisferios ipsilaterales (N=5), contralaterales (N=7), y de ratas *naïve* (N=8). NS: no significativo; \*:  $p < 0,05$

de ambos hemisferios de 4 animales sujetos a oclusión temprana de una narina, se resumen en la figura 10. El curso temporal de los experimentos en ambas condiciones se grafica en la Figura 10A (contralateral) y 10B (ipsilateral). El porcentaje de LTP se evaluó a los 20 minutos del TBS débil, y a los 25 minutos del TBS fuerte, en las ventanas temporales que se indican en la figura. Se observó una tendencia de aumento muy leve en la transmisión sináptica al aplicar el protocolo de inducción débil, pero que no produjo una LTP significativa en las rebanadas del lado contralateral (Fig. 10A, TBS1: transmisión sináptica normalizada en la vía prueba:  $1,09 \pm 0,045$ , vía control  $1,01 \pm 0,03$ ; prueba de los rangos de Wilcoxon,  $P=0,1$ ) ni en las rebanadas ipsilaterales (Fig. 10B: vía prueba:  $1,10 \pm 0,046$ ; control:  $1,02 \pm 0,04$ ; prueba de los rangos de Wilcoxon,  $P=0,3$ ). El % de cambio de la transmisión sináptica producido es similar en rebanadas de ambos hemisferios (Fig. 10C TBS 1, contralateral: (% de cambio  $\pm$  Error)  $8,155 \pm 4,70\%$ ;  $N=4$ ; ipsilateral:  $10,63 \pm 8,93\%$ ,  $N=4$ ; prueba de los rangos de Wilcoxon,  $P=1,0$ ). Como se esperaba, el porcentaje de cambio provocado al aplicar el protocolo de estimulación fuerte (TBS2), tiende a ser, en promedio, mayor que al aplicar el protocolo de estimulación débil. El nivel de LTP inducido en el lado contralateral es similar al lado ipsilateral, a diferencia de lo que se ha observado en otros estudios de la plasticidad en situaciones de privación sensorial (Fig. 10C, TBS2; contralateral:  $41,1 \pm 17,7\%$ ,  $N=4$ ; ipsilateral  $20,4 \pm 13,1\%$ ,  $N=4$ ; prueba de los rangos de Wilcoxon,  $P=0,9$ ). Una observación interesante es que los niveles de LTP de las rebanadas provenientes de los hemisferios ipsi y contralateral, al compararlos con el nivel de LTP de las rebanadas provenientes de ratas *naïve*, vemos que el %LTP alcanzado en las rebanadas del hemisferio contralateral, es significativamente mayor que en rebanadas de ratas *naïve*, pero no es diferente del nivel de potenciación de rebanadas del hemisferio ipsilateral a la privación (Fig. 10D: contralateral:  $38,0 \pm 14,4\%$ ,  $N=5$ ; ipsilateral:  $18,4 \pm 7,5\%$ ,  $N=7$ ; *naïve*:  $6,6 \pm 3,2\%$ ,  $N=8$ ; prueba de Kruskal-Wallis;  $P=0,03$ , prueba *post hoc* comparación de Dunn de Contralateral vs. *Naïve* e Ipsilateral vs. *Naïve*). Este resultado sugiere que la privación



olfatoria puede alterar el nivel de LTP inducido en las sinapsis aferentes de ACo, lo que permite sugerir que el %LTP inducido en el hemisferio contralateral es mayor en comparación con el hemisferio *naïve*.



## DISCUSIÓN

En este trabajo se estudiaron las propiedades plásticas de las sinapsis aferentes de ACo a través del desarrollo postnatal, y como ésta puede ser modificada por la experiencia sensorial olfativa. Los resultados muestran que existe un periodo crítico en la inducción de LTP, a través del primer mes del desarrollo postnatal. Esto se determinó por medio de un protocolo de estimulación eléctrica en TBS, donde la inducción de LTP en promedio es exitosa a ciertas edades del desarrollo postnatal temprano, específicamente a P16-25, y frecuentemente falla al finalizar el primer mes (Fig. 5 A-D). Es más, considerando sólo los casos donde la inducción de LTP es exitosa, se observa que al finalizar el primer mes el máximo nivel de potenciación se encuentra a P16-25, siendo en los rangos de edad P6-15 y P26-34 donde se presentan los niveles de potenciación más bajos (Fig. 5E). Por otro lado, se vio que la transmisión sináptica no cambia significativamente a través del primer mes de vida (Fig. 5F). Como ACo es considerado un "núcleo tipo corteza", donde la estratificación de las capas no es tan organizada, los experimentos de la evaluación de la transmisión basal con baclofeno determinaron en qué medida se estimularon sólo las sinapsis aferentes. Éstos revelaron una contribución de las sinapsis asociativas cuando se ubicaban los electrodos para estimular las fibras provenientes del TOL (Fig. 6). Sin embargo, las tinciones con Nissl en rebanadas de cerebro de rata a diferentes edades (P11 y P20), y marcaje del TOL con biocitina, mostraron que la estimación de la capa I<sub>a</sub> fue la correcta (Fig. 7 y 8).

También se observó que la privación olfatoria en rebanadas de ACo de ratas a P21-25, no afecta a la transmisión basal (Fig. 9), pero curiosamente, sí altera el nivel de potenciación

inducida a P25-34 en el hemisferio contralateral en animales deprivados, comparándolo con rebanadas procedentes de ratas *naïve* (Fig. 10).

### *Existencia de un periodo crítico de inducción de LTP en amígdala olfatoria*

El descubrimiento de la LTP en el hipocampo (Bliss y Lømo, 1973), una estructura del cerebro vinculada con la memoria y el aprendizaje, hizo que se postulara a este tipo de plasticidad sináptica como mecanismo celular que se desencadena durante la formación de memoria. Esta idea se mantuvo como hipótesis hasta que dos grupos demostraron que el aprendizaje produce efectos tipo LTP en hipocampo, potenciando la transmisión sináptica en él, y una vez efectuado el aprendizaje, no es posible inducir LTP *in vitro* en esas conexiones (Whitlock y cols., 2006; Gruart y cols., 2006). Una de las características que se ha visto en estas regiones del cerebro involucradas en la memoria, es el periodo crítico de la plasticidad: una ventana temporal dentro del desarrollo postnatal del animal, donde las sinapsis son más sensibles a la modificación. Sólo dentro de esta etapa del desarrollo es posible inducir en promedio LTP. Ya que la plasticidad está involucrada en maduración y estabilización de circuitos neuronales (Kirwood y cols., 1995; Hensch, 2005), la evaluación del periodo crítico y la plasticidad de las cortezas sensoriales, permiten apreciar su grado de participación en la formación de memoria, así como el desarrollo y la formación de sinapsis en estas cortezas.

Nuestros resultados sugieren que en ACo existe un *periodo crítico*, pues la inducción de la potenciación es en promedio significativa en P16-25, y no a otra edad dentro del primer mes

del desarrollo postnatal. Estos resultados son congruentes con antecedentes de otros blancos de aferencias olfatorias, como en CP, donde se muestra que la inducción de plasticidad es posible en edades tempranas (P3-24), pero no al finalizar el primer mes de desarrollo postnatal (P30; Poo e Isaacson, 2007). En corteza piriforme, durante las primeras tres semanas postnatales se observa una correlación entre el nivel de potenciación alcanzada por la inducción y la edad, es decir, los primeros días inmediatamente posteriores al nacimiento, el nivel de LTP alcanzado es mayor que el nivel de LTP a P18, llegando a una nula inducción a P30 (Poo e Isaacson, 2007). Por otro lado, estos blancos olfatorios también presentan algunas diferencias: Primero, en edades tempranas, la corteza piriforme presenta el máximo nivel de potenciación inducida (P5, Poo e Isaacson, 2007), y ACo, se encontró que el mayor nivel de inducción alcanzado es entre las edades P21-25 (Fig. 4F y 5D). La segunda diferencia es que, después del primer mes postnatal, en corteza piriforme no se reportó inducción de LTP en esa etapa del desarrollo (Poo e Isaacson, 2007); mientras que en ACo, aunque no hay LTP significativa en promedio, se presentaron casos en donde fue posible inducir LTP a esa edad (Fig. 4F y 5D). Es más, en ACo, si se promedian sólo los experimentos con LTP significativa en las edades de P26-34, se observa una potenciación del  $11,9 \pm 3,3\%$ . También en ACo la probabilidad de éxito en la inducción de LTP aumenta en P16-25 (Fig. 5E: 15/18) y disminuye en P26-34 (Fig. 5E: 5/8), por lo que al final del primer mes no sólo disminuye el nivel de potenciación, sino también la probabilidad de inducción de LTP en ACo. Estas diferencias entre ACo y corteza piriforme pueden ser explicadas por las propiedades fisiológicas de ambas cortezas que cambian a través del desarrollo, o por la metodología usada en las distintas investigaciones. Con respecto a la primera diferencia, que en ACo no se induce LTP a edades más tempranas, pero en CP sí, puede ser atribuido en una primera instancia a que en esas edades las sinapsis aferentes no poseen esa propiedad plástica. Hay que tener en cuenta que posiblemente la cantidad de aferencias olfatorias que llegan a ACo sean escasas en esa etapa del desarrollo, por lo que aún la estimulación

eléctrica de la totalidad de las fibras aferentes pudiera ser insuficiente para despolarizar los terminales sinápticos, un paso necesario para la inducción de LTP. Poco se sabe del desarrollo peri y postnatal de ACo, pero hay antecedentes que en corteza piriforme de ratón, recién a P7 se presentan las dos subdivisiones de la capa I, y en P14 se alcanza la máxima cantidad de interneuronas que están presentes en esta capa (Sarma y cols., 2011). Por lo tanto, si el nivel de potenciación inducida no es significativo a edades de P6-10, puede ser por otros factores a nivel de formación de las conexiones en ACo (como una carencia de las sinapsis), más que por una propiedad de las conexiones ya formadas. A pesar de desconocer detalles del desarrollo de ACo, se decidió investigar el rango de edad del desarrollo postnatal más amplio posible, para tener una idea más clara de qué sucedía por lo menos con la transmisión sináptica y la plasticidad en los días postnatales tempranos, hasta el fin del primer mes. La transmisión sináptica basal puede dar una idea de cómo son las conexiones a esa edad (Fig. 4H y 5F). Se observa que no hay diferencias en la respuesta postsináptica en los distintos rangos de edad (Fig. 4H y 5F: P6-10 y P6-15) lo que sugiere en parte que el tamaño de la respuesta postsináptica no es responsable de la disminución en la inducción de LTP hacia fines del desarrollo postnatal, (Fig. 4H P21-25 y P26-30; Fig. 5F P16-25 y P26-34). Sin embargo, no podemos descartar que a edades más tempranas (como se mencionó anteriormente) haya una cantidad de terminales olfatorios y de sinapsis aferentes insuficientes para la despolarización del terminal postsináptico, una de las principales condiciones para que se induzca potenciación. También hay que considerar que su estudio en corteza piriforme, Poo e Isaacson (2007), ocuparon la técnica electrofisiológica de "Patch Clamp" en configuración "Voltage-Clamp", con el cual se puede despolarizar la neurona registrada durante el protocolo de inducción de LTP. En la técnica ocupada en nuestro estudio se mide un registro de voltaje de campo, de manera que no permite manipular el voltaje de las neuronas, por lo que la despolarización del terminal postsináptico es producido únicamente por las fibras aferentes estimuladas durante el protocolo de inducción. Por ello, si lo que impide

inducir LTP en edades tempranas en nuestro estudio es una carencia de aferencias en ACo que no despolarizan suficiente la parte postsináptica, más que las propiedades plásticas de la sinápsis con la técnica de "Whole-Cell" se puede mantener la despolarización necesaria durante la inducción de potenciación.

Con respecto a la segunda diferencia, para cuantificar la plasticidad de la transmisión sináptica de las sinapsis olfatorias, Poo e Isaacson (2007), midieron en neuronas piramidales los potenciales postsinápticos excitatorios (PPSE) evocados por estimulación directa del tracto olfatorio lateral; en cambio, en esta investigación se mide el potencial postsináptico excitatorio de campo (cPPSE, en inglés fEPSP) evocados por la estimulación de los terminales olfatorios provenientes del TOL, que penetran a esa zona. Esto último abarca no sólo las respuestas de las neuronas piramidales, sino que también de las semilunares, que se ha visto que en CP recibe la mayor cantidad de aferencias olfatorias (Suzuki y Bekkers, 2011), y que en Aco posiblemente puedan contribuir de manera significativa a los potenciales de campo. Además, en otros sistemas sensoriales, como corteza visual, se observa que la potenciación de la transmisión sináptica medida con los potenciales postsinápticos de campo disminuye después del primer mes postnatal, pero no es completamente nula (Kirkwood y cols., 1995). Si el tipo de técnica utilizada registra una mayor cantidad de respuestas sinápticas, posiblemente la LTP registrada esporádicamente en ACo a P26-34 en este estudio, fue porque se estaban registrando, además de las sinapsis aferentes otro tipo de respuestas postsinápticas. Esto último fue corroborado con el estudio electrofisiológico realizado para determinar la contribución de sinapsis asociativas y aferentes, el cual mostró de que hay una contribución de las sinapsis asociativas en nuestros experimentos (Fig.6), ésta puede ser la razón, en parte, de los resultados obtenidos con respecto a la inducción de LTP al finalizar el primer mes. En los primeros estudios de plasticidad en

corteza piriforme, realizados en ratas adultas, y donde ocuparon la técnica de registro de campo, observaron con una frecuencia muy baja la inducción de LTP exitosa (Jung y cols., 1990 [1 de 13 experimentos]; Kanter y Haberly, 1990 [5 de 18 experimentos]). Todas las técnicas presentan ventajas y desventajas para el estudio de plasticidad en ACo. Nuestra aproximación metodológica es óptima, pues registra la actividad de la circuitería completa de la zona, lo más cercano a lo que sucedería si estuviéramos estudiando el fenómeno *in vivo*. Resulta interesante que, a pesar de la contribución de las sinapsis asociativas, las cuales siguen manteniendo la posibilidad de inducir plasticidad incluso después del primer mes postnatal (Poo e Isaacson, 2007), se logre diferenciar un periodo crítico en las sinapsis aferentes olfatorias. Puede ocurrir, que la formación de las capas de ACo, como también la formación de conexiones sinápticas, sea una dinámica constante que implique una diferencia en el grosor de las capas de una edad a otra, y por ello se observe contribuciones distintas de las sinapsis asociativas según la edad, a pesar de ubicar los electrodos de una misma manera en todos los experimentos. Como se puede apreciar en la Fig. 6, donde a edades tempranas la contribución de estas sinapsis es escasa, pero va aumentando con la edad (P6-10: 15,67% contribución de sinapsis asociativas a la respuesta sináptica total; 56,34% en P25-34).

Las tinciones permitieron una mayor comprensión de la arquitectura de ACo, y la formación de las capas de células de esa zona. En rebanadas provenientes de ratas de edades más tempranas, se observa una estructura similar a las de edades más tardías, pero con una clara diferencia en el tamaño de la capa I. La capa II se identificó claramente por los somas de las neuronas principales, pero la capa I se dedujo como la parte donde la densidad de cuerpos celulares era menor (Fig. 7A y D). Se puede distinguir claramente la parte donde está ACo, y diferenciarlo del resto de núcleos colindantes, gracias a la diferente distribución cuerpos

celulares en cada uno (Fig. 7B flechas). A través del eje antero-posterior del cerebro de rata, en rebanadas posteriores, ACo se diferencia del resto de otros núcleos de la misma manera que en rebanadas anteriores (Fig. 7C y D). La corteza piriforme se nota claramente por la capa II de los cuerpos celulares, mientras que en la zona ventral, el límite de los cuerpos celulares, que determina la transición entre las capas I y II, comienza a difuminarse, llegando a una capa con cuerpos celulares más desorganizados, pero sin perder composición identificada de la capa II (Fig. 7C y D, flecha límite de ACo y PAC). Con la contrainción (detección de biocitina), es interesante el hecho de que fibras provenientes del TOL, abarcan toda la capa I (región con escasos cuerpos celulares), e incluso ingresan hacia la capa II (Fig. 8C y 8C'). No se puede asegurar que las fibras que se internan en la capa II tienen contactos sinápticos directamente con los somas de ésta capa, pero la distribución de las fibras teñidas es sugerente. No podemos descartar que también se hayan marcado las fibras del tracto olfatorio accesorio, pues el cristal de biocitina se incrustó en la zona del TOL, en donde los dos tractos tienen el mismo recorrido. De todas maneras, este hecho no afecta las conclusiones de los resultados obtenidos, pues el órgano vomeronasal envía aferencias ipsilateralmente a ACo (Pro-sistiaga y cols., 2007), y responde a estímulos olfativos biológicamente relevantes de igual manera que el epitelio olfatorio, así que contribuye igualmente a ambos hemisferios, y no perturba las interpretaciones de los resultados obtenidos.

Las diferencias entre los resultados obtenidos en ACo y los estudios realizados en corteza piriforme, se pueden interpretar como un reflejo de los diferentes orígenes embrionarios y del desarrollo, así como las diferencias en los roles que desempeñan en procesos de memoria y aprendizaje. El estudio realizado por Sevelinges y cols. (2004) da cuenta de eso; mediante registro *in vivo* muestran como la transmisión sináptica estimulada por el tracto olfatorio lateral en



ACo aumenta persistentemente después de que el animal pasara por un condicionamiento del miedo, y este aumento es mayor cuando se presenta el olor al que fue condicionado. En corteza piriforme en cambio, se observa que no cambia la transmisión sináptica en la parte posterior, mientras que en la parte anterior el aumento es transitorio, pues sólo se manifiesta en presencia del olor condicionado (Sevelinges y cols., 2004). Como ACo es una fuente importante de aferencias hacia el hipotálamo, el cual está involucrado en el control de respuestas autonómicas, los autores teorizan que esta característica fisiológica de ACo permitiría al animal desarrollar una respuesta conductual más rápida frente a estímulos aversivos. Otro antecedente que asocia ACo con el aprendizaje asociativo del miedo es que en cría de ratas, la respuesta de aversión frente al estímulo condicionado se expresa recién a los 10 días postnatal, antes de eso, se presenta un comportamiento de preferencia al estímulo condicionado. Dentro de ese mismo periodo postnatal, surge también la plasticidad de la transmisión sináptica de las conexiones que van desde ACo a BLA (Thompson y cols., 2008). De manera que todos estos datos involucran a ACo con procesos de aprendizaje.

El concepto de "Periodo crítico", es empleado para definir una etapa del desarrollo postnatal de un animal en que la experiencia, que resulta de una interacción constante entre el sistema nervioso y del medio externo, influye irreversiblemente en la formación del sistema nervioso. Como se mencionó anteriormente, en el periodo crítico, los circuitos neuronales son más susceptibles a los cambios, provocando variaciones en las propiedades fisiológicas en las conexiones sinápticas, entre ellas la inducción de la potenciación, que es un mecanismo celular que se desencadena durante los procesos de memoria (Whitlock y cols., 2006; Gruart y cols., 2006). Desde un punto de vista evolutivo, y tomando en cuenta gran parte del desarrollo está programado por la carga genética, esta ventana temporal permite al animal adaptarse al medio en

que nace, pues esa información no está en el genotipo (Hensch, 2004). Hay distintos tipos de ventanas temporales en donde la experiencia influye en el individuo, en concordancia con el desarrollo de cada modalidad sensorial, así como el grado de utilización de esa modalidad sensorial en la percepción del mundo exterior. En la capa IV de la corteza somatosensorial, que recibe información sensorial de las vibrisas a través de aferencias talámicas ventrobasales, es posible inducir LTP cuyo periodo crítico es hasta la primera semana de desarrollo postnatal (P3-8), después del cual la potenciación inducida es casi nula (Crair y Malenka, 1995). Esto concuerda con el uso de las vibrisas en la cría de rata, las cuales desde el momento del nacimiento están buscando a la madre en busca de calor y comida. Por otro lado, el sentido de la visión no es ocupado en ratas hasta aproximadamente el día P13-14, que es la edad en la cual abren los ojos, comienzan a recibir estímulos visuales, y exploran adentro del nido (Kail y cols., 1984); el periodo crítico de las sinapsis aferentes de la capa III en la corteza visual es desde P14 a P21 (Kirkwood y cols., 1995). En cuanto desarrollo del sistema gustativo, si bien hay un periodo crítico de la formación de las proyecciones desde la lengua hasta las zonas receptoras de estas aferencias (P1-25) que es dependiente de la integridad del receptor (Lasiter, 1991), no se ha reportado un periodo crítico de la inducción de plasticidad *in vitro* o *in vivo* (Maeda y cols., 2013).

Considerando estas observaciones en otros sistemas sensoriales, en ACo posiblemente el periodo crítico empiece en edades tempranas (aunque con la técnica experimental usada no podamos distinguirlo (figuras 4A y 4F; 5A y 5D)), debido a que el sistema olfativo y sobre todo el complejo de la amígdala es esencial para el fenómeno de la impronta (Leon 1992; Thompson y cols., 2008; Sullivan y Holman, 2010), en que los animales recién nacidos aprenden a identificar y reconocer a miembros de su propia especie (Hensch, 2004; Knudsen, 2004). Bajo la

misma lógica, si se observa la edad en la cual se presenta una mayor potenciación, ésta es cerca de los P21-25 (Fig. 4D y 4F). Esta etapa del desarrollo está caracterizada por el destete y por la exploración fuera del nido, exponiendo al animal a nuevos estímulos olfativos (Kail y cols., 1984). Los cambios en las conexiones neuronales que se producen en ACo de manera que aumente el nivel de LTP inducida, pueden estar relacionados con la característica evolutiva de adaptar al animal a nuevos estímulos olfativos como el olor de un depredador o el olor del nido para regresar después de las exploraciones.

A edades más tardías, el nivel de potenciación es significativamente menor con respecto a los otros rangos de edad (ver Fig. 4E, 4F P26-34, 5C, 5D P26-34), pero no desaparece completamente. Esto podría ser congruente con la capacidad de adaptación del animal a otros ambientes. Además, no es descartable que otras sinapsis dentro de ACo, como las sinapsis asociativas (entre neuronas de ACo u otras partes del cerebro) sean las que cambien acorde con el ambiente, aunque no tengan conexiones directas. ACo es un núcleo tipo corteza que recibe aferencias y envía conexiones a otros núcleos de amígdala, así como a otras partes del cerebro (Pro-sistiaga y cols., 2007), cuyas sinapsis pueden ser modificadas por experiencias posteriores.

*La deprivación olfatoria no modifica la transmisión basal en ACo, pero sí altera el nivel de potenciación inducido en el hemisferio no deprivado.*

La experiencia durante un periodo crítico puede modificar las propiedades del sistema nervioso de manera irreversible. En las conexiones sinápticas, estas modificaciones se pueden reflejar en la transmisión sináptica basal. Se ha descrito que los procesos de maduración de sinapsis, los cuales se correlacionan estrechamente el final del periodo crítico de inducción de

plasticidad, coinciden con una variación de los receptores postsinápticos glutamatérgicos de tipo NMDA y AMPA. Se ha descubierto que estos cambios apreciados durante el periodo crítico son dependientes de la experiencia, pues con privación sensorial, se ha demostrado que es posible modificar la duración del periodo crítico, aumentando la ventana temporal de su duración y aplazando los cambios en la contribución de los receptores NMDA a la respuesta sináptica (Kirkwood y cols., 1995; Carmignoto y Vicini, 1992; Lu y cols., 2001). Entonces, en esta tesis se evaluó cómo afecta la privación sensorial olfativa a la transmisión y plasticidad sináptica en ACo. En una primera instancia se vio que ocurría en ACo con la transmisión sináptica basal. Las curvas entrada-salida, que en este caso relacionan la intensidad de estimulación con la actividad postsináptica, no mostraron diferencias significativas entre las rebanadas provenientes del hemisferio contralateral e ipsilateral (Figuras 9 B y C). El resultado obtenido puede ser explicado porque la privación no afecta la transmisión sináptica basal, o porque el nivel de resolución del experimento no permite percibir los cambios ocurridos en la transmisión sináptica. Probablemente, como ocurre en corteza piriforme o corteza somatosensorial, la modificación se puede producir a nivel de la relación de receptores postsinápticos de NMDA/AMPA, (Lu y cols., 2001; Franks e Isaacson, 2005), o en el cambio del tipo de subunidades en receptores NMDA, como ocurre en corteza visual (Carmignoto y Vicini., 1992; Quinlan y cols., 1999), pero no en la transmisión basal. Por lo tanto, no podemos descartar que la mantención de la transmisión sináptica basal después de la privación, se dé en presencia de un cambio en la proporción de receptores glutamatérgicos, como se ha visto en otras cortezas. Nuevos experimentos, que impliquen poder diferenciar la contribución de los distintos receptores (AMPA y NMDAR) en las respuestas sinápticas, deberán ser realizados para comprobar esta hipótesis. Asimismo, la privación sensorial olfativa podría alterar la formación de sinapsis, o la distribución de las aferencias olfatorias en las distintas capas de ACo, como ocurre en corteza somatosensorial, donde el uso temprano de las vibrisas es crítico para el

normal desarrollo de las aferencias talamocorticales (Fox y cols., 2002). También podrían participar procesos homeostáticos, donde la privación gatillaría modificaciones en la sinapsis que se oponen a la alteración a la que fue sometida, compensando los cambios, como ocurre en hipocampo, que al ser sometido a una inhibición crónica de la actividad, aumenta las corrientes postsinápticas excitatorias en miniatura (mEPSC), pero al disminuir la actividad de la red neuronal, los mEPSC disminuyen de amplitud (Turrigiano y cols., 1998), de manera que esos cambios no se pueden observar con la técnica electrofisiológica utilizada. Experimentos histológicos y electrofisiológicos adecuados podrían ser realizados para demostrar esta posibilidad en ACo.

Algo análogo a los experimentos de las curvas entrada-salida sucedió cuando se probó el efecto de la privación olfativa en la potenciación inducida en ACo, ya que no se observan diferencias significativas entre las rebanadas provenientes de los hemisferios contralateral e ipsilateral a la privación (Fig. 10 A y B, segundo TBS). Se deberán realizar más experimentos para aumentar el número de datos, y determinar la significancia con una muestra mayor. Sería interesante determinar que efectivamente hay una mayor potenciación en el lado contralateral que en el lado ipsilateral, quizás llevado a cabo por un sistema de compensación homeostática, visto en otros sistemas sensoriales. En el sistema visual, por ejemplo, la exposición a la oscuridad produce un aumento en la duración del periodo crítico (Kirkwood y cols., 1995). En otro estudio, utilizando la misma técnica de privación sensorial, reportó un aumento de las corrientes sinápticas excitatorias en miniatura en animales expuestos a la oscuridad (He y cols., 2012). Otras investigaciones que evalúan el efecto de la privación monocular (sutura de párpados por 5-7 días) en la respuesta de las neuronas de zona binocular de la corteza visual, encontraron un aumento de la respuesta provocada por la estimulación del ojo no privado, y

una disminución de la respuesta por la estimulación del ojo privado (Mrsic-Flogel y cols., 2007). Por lo tanto, en ACo, la privación olfatoria puede producir una compensación funcional por parte del hemisferio contralateral, si es que hay una diferencia significativa con un mayor número de datos.

Otro aspecto importante que se observa en comparación a la corteza piriforme, es que no hay diferencia con el protocolo de inducción de LTP débil (Fig. 10 A, B y C, TBS1). Normalmente el protocolo débil en corteza piriforme no induce LTP, pero sí lo hace en un hemisferio ipsilateral a la privación. Esto pudo ocurrir porque la privación sensorial quizás no altere el umbral de inducción (es decir, que con un protocolo débil se pueda inducir LTP), sino la amplitud de la potenciación inducida. En hipocampo, se ha visto que la inhibición de la actividad medida en rebanadas en cultivo provoca un aumento en la inducción de LTP, y el mecanismo que media este aumento es la formación de nuevas sinapsis silentes, las cuales se caracterizan por tener sólo receptores NMDA. La inducción de LTP mediante actividad produce la inserción de los receptores AMPA de manera que aumenta la respuesta sináptica excitatoria (Arendt y cols., 2013). Mecanismos similares pueden tener lugar en ACo, aunque también se debe considerar que el caso de los experimentos realizados en esta tesis es más complejo: Arendt pudo bloquear totalmente la actividad de la rebanada de hipocampo en cultivo exponiéndolo a TTX. Sin embargo, en ACo, nuestros experimentos de privación sensorial olfatoria no controlan las posibles señales provenientes desde otros sentidos, que si bien no tienen aferencias directas hacia esta corteza, tienen contactos sinápticos a través de otras cortezas de asociación (Pitkänen y cols., 1997; Sah y cols., 2003). Estos pueden influir en los posibles cambios sinápticos de ACo por la privación sensorial, como se observa en las investigaciones de la privación visual, que disminuye la mEPSC de las neuronas piramidales de la corteza

somatosensorial, resultado de una disminución en la proporción de las subunidades GLUR1/GLUR2 de los receptores AMPA (Goel y cols., 2006; He y cols., 2012). De manera que si hay un cambio, o una mantención de la inducción en ACo en rebanadas del hemisferio contralateral, no hay que descartar la posible intervención de aferencias sinápticas de otras zonas que llegan a ACo, pues los núcleos de la amígdala están recíprocamente conectados entre sí, y con otros sectores de la corteza (plasticidad cruzada, He y cols., 2012).

Un resultado muy interesante surge de comparar la LTP inducida en rebanadas de ACo de animales *naïve*, que no han sufrido privación, en comparación con las rebanadas provenientes del hemisferio contralateral, de animales que han sido sometidos a la cauterización nasal. En estos experimentos, la LTP inducida en rebanadas que proceden del hemisferio contralateral, es significativamente mayor que el de las ratas *naïve*, (Fig 10D: contralateral, ipsilateral y *naïve*). La manipulación realizada por el experimentador en animales privados, tanto como la privación sensorial en sí, puede alterar la plasticidad en ACo. Se ha reportado que factores estresantes como la privación del sueño o el alejar a la madre de las crías puede alterar la plasticidad y la cantidad de receptores de neuromoduladores en distintas zonas del cerebro, como el hipocampo o la amígdala (Kim y cols., 2005; Moriceau y Sullivan 2006; Champagne y cols., 2008). Esto puede producir un cambio en la LTP inducida, ya que la manipulación del animal es realizada durante el desarrollo postnatal temprano, específicamente en el primer mes postnatal, tiempo donde tiene lugar el ya mencionado periodo crítico de la corteza sensorial primaria somatosensorial, visual y olfativa (Crair y Malenka, 1995; Kirkwood y cols., 1996; Franks e Isaacson 2005). Además, está descrito que el complejo de la amígdala participa en procesos de memoria emocional y estrés (LeDoux, 2000; Sah y cols, 2003; Paré, 2003), por lo que no es de extrañar que la manipulación a temprana edad repercuta en la

formación de esta parte del sistema nervioso. Con respecto a esto último, sería interesante evaluar la proporción de las componentes aferentes/asociativas en ACo durante la privación olfativa, pues puede producirse una competencia de estas sinapsis en la corteza, y la ausencia de las aferencias provocaría un aumento en la cantidad de otras sinapsis presentes. Puede suceder también, que el hemisferio contralateral a la privación compense funcionalmente al ipsilateral, en ausencia de aferencias olfatorias. Por lo mismo, en los experimentos realizados, mantener un hemisferio como control de la operación efectuada en el animal, hace posible ver hasta cierto punto, el efecto producido por la manipulación experimental.

La influencia que tiene el medio externo en la determinación de las conexiones del cerebro está comprobada en distintos sistemas sensoriales (Kirkwood y cols., 1995; Fox y cols., 2002; Philpot y cols., 2001; Franks e Isaacson, 2005), de manera que, interpretándolo desde un punto de vista evolutivo, permite al animal adaptarse a su entorno. El sentido del olfato es usado de manera temprana en mamíferos, y es esencial para la supervivencia, pero aún falta aclarar varios aspectos de la influencia de la experiencia en el desarrollo. El saber del periodo crítico y la sensibilidad de las sinapsis de ACo por la privación sensorial contribuirán a saber en qué medida influye la experiencia sensorial de relevancia biológica en el desarrollo de la corteza cerebral.



## CONCLUSION

Los resultados de este trabajo revelan que las sinapsis aferentes de ACo, formadas por las proyecciones del TOL y las dendritas de las neuronas principales, poseen un periodo crítico de inducción de potenciación, que abarca desde etapas tempranas postnatales (P11-15), hasta finalizar el primer mes postnatal (P26-34). Nuestros resultados sugieren que la privación sensorial altera este periodo crítico, posibilitando la inducción de LTP en los animales privados en edades donde se termina el periodo crítico, y dejando un nivel de LTP mayor en el hemisferio contrario a la privación. Esto significaría la posible participación de mecanismos de compensación similares a los reportados en otros sistemas sensoriales, donde la privación sensorial provoca en un circuito sináptico, una compensación funcional de los circuitos que no han sido alterados. Sin embargo, no podemos descartar que los resultados en la privación sensorial se relacionen con otros factores, como el estrés sufrido por los animales neonatos durante la manipulación que implica la oclusión nasal. Si este fuera el caso, también estaríamos frente a una forma de modulación/compensación que extiende el periodo crítico en este circuito sensorial.

## BIBLIOGRAFÍA

Arendt, K. L., Sarti, F., y Chen, L. (2013). Chronic inactivation of a neural circuit enhances LTP by inducing silent synapse formation. *The Journal of Neuroscience*, 33(5), 2087–96.

Bear, M., y Malenka, R. (1994). Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Current Opinion in Neurobiology*, 4, 389–399.

Bliss, T., y Lømo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology*, 232, 331–356.

Carmignoto, G., y Vicini, S. (1992). Decrease in NMDA Receptor Responses During Development of the Visual Cortex, 1992.

Caroni, P., Donato, F., y Muller, D. (2012). Structural plasticity upon learning: regulation and functions. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(7), 478–90.

Champagne, D. L., Bagot, R. C., van Hasselt, F., Ramakers, G., Meaney, M. J., de Kloet, E. R., Krugers, H. (2008). Maternal care and hippocampal plasticity: evidence for experience-dependent structural plasticity, altered synaptic functioning, and differential responsiveness to glucocorticoids and stress. *The Journal of Neuroscience*, 28(23), 6037–45.

Chang, S. L., LoTurco, J. J., y Nisenbaum, L. K. (2000). In vitro biocytin injection into perinatal mouse brain: a method for tract tracing in developing tissue. *Journal of Neuroscience Methods*, 97(1), 1–6.



Crair, M., y Malenka, R. (1995). A critical period for long-term potentiation at thalamocortical synapses. *Nature*, 375(25), 325–328.

Dielenberg, R. A., Hunt, G. E., y McGregor, I. S. (2001). ‘When a rat smells a cat’: the distribution of Fos immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor. *Neuroscience*, 104(4), 1085-1097

Feldman, D. E., Nicoll, R. A., y Malenka, R. C. (1999). Synaptic plasticity at thalamocortical synapses in developing rat somatosensory cortex: LTP, LTD, and silent synapses. *Journal of Neurobiology*, 41(1), 92–101.

Fox, K. (2002). Anatomical pathways and molecular mechanisms for plasticity in the barrel cortex. *Neuroscience*, 111(4), 799–814.

Franks, K. M., y Isaacson, J. S. (2005). Synapse-specific downregulation of NMDA receptors by early experience: a critical period for plasticity of sensory input to olfactory cortex. *Neuron*, 47(1), 101–14.

García-Moreno, F., Pedraza, M., Di Giovannantonio, L. G., Di Salvio, M., López-Mascaraque, L., Simeone, A., y De Carlos, J. A. (2010). A neuronal migratory pathway crossing from diencephalon to telencephalon populates amygdala nuclei. *Nature Neuroscience*, 13(6), 680–9.

Gil, Z., Connors, B. W., y Amitai, Y. (1997). Differential regulation of neocortical synapses by neuromodulators and activity. *Neuron*, 19(3), 679–86.

Goel, A., Jiang, B., Xu, L., y Song, L. (2006). Cross-modal regulation of synaptic AMPA receptors in primary sensory cortices by visual experience. *Nature Neuroscience*, 9(8), 1001–1003.

Gruart, A., Muñoz, M. D., y Delgado-García, J. M. (2006). Involvement of the CA3-CA1 synapse in the acquisition of associative learning in behaving mice. *The Journal of Neuroscience*, 26(4), 1077–87.

He, K., Petrus, E., Gammon, N., y Lee, H.-K. (2012). Distinct sensory requirements for unimodal and cross-modal homeostatic synaptic plasticity. *The Journal of Neuroscience*, 32(25), 8469–8474.

Hensch, T. K. (2004). Critical period regulation. *Annual Review of Neuroscience*, 27, 549–79.

Hensch, T. K. (2005). Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(11), 877–88.

Huerta, P., y Lisman, J. E. (1993). Heightened synaptic plasticity of hippocampal CA1 neurons during a cholinergically induced rhythmic state. *Nature*, 364, 723–725.

Jung, M., Larson, J., y Lynch, G. (1990). Long-term potentiation of monosynaptic EPSPs in rat piriform cortex in vitro. *Synapse*, 6, 279–283.

Kanter, E., y Haberly, L. (1990). NMDA-dependent induction of long-term potentiation in afferent and association fiber systems of piriform cortex in vitro. *Brain Research*, 525, 175–179.

Kail Jr, R. V., Spear, N. E., y Kail Jr, R. V. (Eds.). (1984). *Comparative perspectives on the development of memory*. 93-96. Psychology Press. New Jersey

Kim, E. Y., Mahmoud, G. S., y Grover, L. M. (2005). REM sleep deprivation inhibits LTP in vivo in area CA1 of rat hippocampus. *Neuroscience Letters*, 388(3), 163–7.

Kirkwood, A., Lee, H., y Bear, M. (1995). Co-regulation of long-term potentiation and experience-dependent synaptic plasticity in visual cortex by age and experience. *Nature*, 375(25), 329–331.

- Kirkwood, A., Rioult, M., y Bear, M. (1996). Experience-dependent modification of synaptic plasticity in visual cortex. *Nature*, 381(6), 526–528.
- Knudsen, E. I. (2004). Sensitive periods in the development of the brain and behavior. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 16(8), 1412–25.
- Lasiter, P. S. (1991). Effects of early postnatal receptor damage on dendritic development in gustatory recipient zones of the rostral nucleus of the solitary tract. *Developmental brain research*, 61(2), 197–206.
- LeDoux, J. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annual Review of Neuroscience*, 23, 155–184.
- Leon, M. (1992). The neurobiology of filial learning. *Annual Review of Psychology*, 43, 377–98.
- Lu, H. C., Gonzalez, E., y Crair, M. C. (2001). Barrel cortex critical period plasticity is independent of changes in NMDA receptor subunit composition. *Neuron*, 32(4), 619–34.
- Maeda, N., Kawakami, S., Ohmoto, M., le Coutre, J., Vinyes-Pares, G., Arigoni, F., Misaka, T. (2013). Differential expression analysis throughout the weaning period in the mouse cerebral cortex. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 431(3), 437–43.
- McDonald, A. J. (1998). Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Progress in neurobiology*, 55(3), 257–332.
- Moriceau, S., y Sullivan, R. (2006). Maternal presence serves as a switch between learning fear and attraction in infancy. *Nature Neuroscience*, 9(8), 1004–1006.

Mrsic-Flogel, T. D., Hofer, S. B., Ohki, K., Reid, R. C., Bonhoeffer, T., y Hübener, M. (2007). Homeostatic regulation of eye-specific responses in visual cortex during ocular dominance plasticity. *Neuron*, 54(6), 961–72.

Okano, H., Hirano, T., y Balaban, E. (2000). *Learning and memory*, 97(23), 12403–12404.

Otto, T., Eichenbaum, H., Wiener, S. I., y Wible, C. G. (1991). Learning-related patterns of CA1 spike trains parallel stimulation parameters optimal for inducing hippocampal long-term potentiation. *Hippocampus*, 1(2), 181–92.

Paré, D. (2003). Role of the basolateral amygdala in memory consolidation. *Progress in Neurobiology*, 70(5), 409–420.

Phifer, C. B., y Terry, L. M. (1986). Use of Hypothermia for General Anesthesia in Preweanling Rodents. *Physiology y Behavior*, 38, 887–890.

Philpot, B. D., Sekhar, a K., Shouval, H. Z., y Bear, M. F. (2001). Visual experience and deprivation bidirectionally modify the composition and function of NMDA receptors in visual cortex. *Neuron*, 29(1), 157–69.

Pitkänen, a, Savander, V., y LeDoux, J. E. (1997). Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends in Neurosciences*, 20(11), 517–23.

Poo, C., e Isaacson, J. S. (2007). An early critical period for long-term plasticity and structural modification of sensory synapses in olfactory cortex. *The Journal of Neuroscience*, 27(28), 7553–8.

Price, J. L. (1973). An autoradiographic study of complementary laminar patterns of termination of afferent fibers to the olfactory cortex. *Journal of Comparative Neurology*, 150(1), 87-108.

Pro-Sistiaga, P., Mohedano-Moriano, A., Ubeda-Bañon, I., del mar Arroyo-Jimenez, M., Marcos, P., Artacho-Pérula, E., Crespo, C., Insausti, R. and Martinez-Marcos, A. (2007), Convergence of olfactory and vomeronasal projections in the rat basal telencephalon. *J. Comp. Neurol.*, 504: 346–362.

Quinlan, E. M., Olstein, D. H., y Bear, M. F. (1999). Bidirectional , experience-dependent regulation of N-methyl- D -aspartate receptor subunit composition in the rat visual cortex during postnatal development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(22), 12876–12880.

Rogan, M. T., y LeDoux, J. E. (1995). LTP is accompanied by commensurate enhancement of auditory-evoked responses in a fear conditioning circuit. *Neuron*, 15(1), 127–36.

Rogan, M., Stäubli, U., y LeDoux, J. (1997). Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature*, 391(391), 604–607.

Rumpel, S., LeDoux, J., Zador, A., y Malinow, R. (2005). Postsynaptic receptor trafficking underlying a form of associative learning. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5718), 83–8.

Sah, P., Faber, E. S. L., Lopez De Armentia, M., y Power, J. (2003). The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiological Reviews*, 83(3), 803–34.

Sanhueza, M., y Bacigalupo, J. (2005). Intrinsic subthreshold oscillations of the membrane potential in pyramidal neurons of the olfactory amygdala. *The European Journal of Neuroscience*, 22(7), 1618–26.

Sarma, A. a, Richard, M. B., y Greer, C. a. (2011). Developmental dynamics of piriform cortex. *Cerebral Cortex*, 21(6), 1231–45.

Sevelinges, Y., Gervais, R., Messaoudi, B., Granjon, L., y Mouly, A.-M. (2004). Olfactory fear conditioning induces field potential potentiation in rat olfactory cortex and amygdala. *Learning and Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 11(6), 761–9.

Shiple, M. T., y Ennis, M. (1996). Functional organization of olfactory system. *Journal of Neurobiology*, 30(1), 123–76.

Sullivan, R. M., y Holman, P. J. (2010). Transitions in sensitive period attachment learning in infancy: the role of corticosterone. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 34(6), 835–44.

Suzuki, N., y Bekkers, J. M. (2011). Two layers of synaptic processing by principal neurons in piriform cortex. *The Journal of Neuroscience*, 31(6), 2156–66.

Swanson, L., y Petrovich, G. (1998). What is the amygdala? *Trends in Neurosciences*, 21(8), 323–331.

Tang, A. C., y Hasselmo, M. E. (1994). Selective suppression of intrinsic but not afferent fiber synaptic transmission by baclofen in the piriform (olfactory) cortex. *Brain Research*, 659(1-2), 75–81.

Thompson, J. V, Sullivan, R. M., y Wilson, D. a. (2008). Developmental emergence of fear learning corresponds with changes in amygdala synaptic plasticity.

Turrigiano, G. G., Leslie, K. R., Desai, N. S., Rutherford, L. C., y Nelson, S. B. (1998). Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature*, 391(6670), 892–6.

Vera, J., Pezzoli, M., Pereira, U., Bacigalupo, J., y Sanhueza, M. (2014). Electrical Resonance in the  $\theta$  Frequency Range in Olfactory Amygdala Neurons. *PloS One*, 9(1), e85826.

Whitlock, J. R., Heynen, A. J., Shuler, M. G., y Bear, M. F. (2006). Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science (New York, N.Y.)*, 313(5790), 1093–7.



Zhang, L. I., y Poo, M. M. (2001). Electrical activity and development of neural circuits. *Nature Neuroscience*, 4, 1207–14.