

Universidad de Valparaíso
Facultad de Medicina
Escuela de Psicología
Centro de Neurociencias de Valparaíso

Cambios en el estado de metilación en el promotor del exón I del gen de BDNF y en la expresión de BDNF asociados a la Tarea de Reconocimiento Espontáneo de Objetos en corteza perirrinal de ratas *Sprague dawley*

Seminario para optar al grado de Licenciado en Psicología

Mauricio Aspé Sánchez

Luis Contreras Huerta

Director de Tesis

Dr. Adrián Palacios Vargas

Co-director

Dr. Pablo Muñoz Carvajal

Valparaíso, 20 de agosto de 2008.

INDICE

| | |
|---|----|
| Agradecimientos | 4 |
| Abreviaciones | 5 |
| Resumen | 6 |
| Antecedentes | 7 |
| Memoria: conceptos | 7 |
| Tarea de reconocimiento espontáneo de objetos | 9 |
| Memoria y plasticidad | 11 |
| Corteza perirrinal | 12 |
| Epigenética | 14 |
| BDNF y plasticidad sináptica | 16 |
| Hipótesis | 18 |
| Objetivo general | 19 |
| Objetivos específicos | 20 |
| Materiales y métodos | 22 |
| Sujetos | 22 |
| TREO | 22 |
| Aparatos | 22 |
| Procedimiento | 23 |
| Análisis | 24 |
| Experimento 1 | 25 |
| Experimento 2 | 26 |
| Microdisseccion Corteza Perirrinal | 27 |

| | |
|---|----|
| Aislamiento ADN genómico y PCR específico para metilación | 27 |
| Aislamiento del DNA genómico | 27 |
| Modificación del ADN genómico con bisulfito de sodio | 28 |
| Purificación del ADN | 28 |
| Ensayo de metilación por PCR en el promotor de BDNF | 28 |
| Western Blot | 29 |
| Resultados | 31 |
| Conducta | 31 |
| Experimento 1 | 31 |
| Experimento 2 | 34 |
| Biología molecular | 36 |
| Bioquímica | 41 |
| Conclusiones | 46 |
| Discusión | 47 |
| Referencias | 49 |

AGRADECIMIENTOS

Hay ciertas personas a quienes ambos agradecemos en conjunto, pues en nuestro trabajo en los laboratorios fueron de vital importancia para concluir este escrito que el lector tiene en sus manos: al Dr. Adrián Palacios, quien confió en nosotros para permitirnos explorar otras áreas dentro del amplio abanico de la psicología, al Prof. Ps. Errol Dennis, quien nos entregó su confianza y apoyo para embarcarnos en este proyecto. Además nos gustaría mencionar a Álvaro Ardiles y Claudio Elgueta, quienes nos entregaron retroalimentación constante respecto a lo que se hacía. Pero sin lugar a dudas, una persona que nos entregó un importantísimo apoyo, y de quién aprendimos mucho en estos meses, fue el Dr. Pablo Muñoz, que, entre otras cosas, participó activamente en las discusiones de las cuales emergieron las primeras ideas para el proyecto de tesis, y nos enseñó a movernos en los laboratorios y a utilizar los instrumentos pertinentes.

Mauricio quisiera agradecer a Manuel, obrero, patriarca, maestro, sepultado para recordarnos que la vida es un proyecto destinado al fracaso, recordado como ejemplo de vida.

Sebastián agradece a Luis, Patricia y Rodrigo, quienes no son recordados por esta acción en particular, sino por el trazo que han dibujado hasta el punto actual.

ABREVIACIONES

BDNF: Brain-derived neurotrophic factor (Factor neurotrófico derivado del cerebro)

PS: Plasticidad Sináptica

CPr: Corteza Perirrinal.

TREO: Tarea de reconocimiento espontáneo de objetos

FM: Fase de Muestra

FE: Fase de elección

D2: Índice de reconocimiento

|D2|: Índice de reconocimiento absoluto

HC: Hipocampo

LTP: Long-term potentiation (Potenciación a largo plazo)

LTD: Long-term depression (Depresión a largo plazo)

A1 – A2: Objetos fase de muestra

A3: Objeto familiar fase de elección

B: Objeto nuevo fase de elección

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)

RESUMEN

La memoria de reconocimiento es un tipo de memoria asociado a la corteza perirrinal, que puede ser evaluada aplicando una tarea de reconocimiento espontáneo de objetos, la cual consiste en la discriminación visual de un objeto familiar (A3) vs. un objeto novedoso (B).

El factor neurotrófico derivado de cerebro, está involucrado en plasticidad sináptica, aprendizaje y memoria. La regulación génica de BDNF es compleja, siendo recientemente demostrado que paradigmas de memoria espacial inducen cambios epigenéticos en el estado de metilaciones del ADN en el gen de BDNF. En el presente trabajo estudiamos el índice de reconocimiento asociándolo con cambios en la expresión de BDNF y el grado de metilación en el promotor del exón I de su gen en la CPr de ratas *Sprague dawley*.

Las ratas fueron sometidas a tres sesiones de TREO, con un retraso entre la fase de muestra y la fase de elección de 1 minuto, 3 horas y 24 horas, para cada grupo. Los mayores índices de reconocimiento ($|D2|$) se observaron en el grupo experimental de 3 horas, por lo que se estudió en este grupo cambios en la expresión de BDNF y en el estado de metilación de su promotor, dos horas después de finalizada la tercera sesión. Para ello, se microdisectó la CPr del grupo estudiado y se aisló el ADN genómico, analizando el estado de metilación del gen por PCR específico y la expresión de BDNF mediante inmunoblot. Los resultados muestran que una preferencia por A3 o por B en la FE debe considerarse como discriminación exitosa. Además, encontramos una correlación negativa entre la metilación del gen de BDNF y $|D2|$ y una correlación positiva entre la expresión de BDNF y $|D2|$, consistente con los modelos epigenéticos que asocian la pérdida de metilación con activación génica, sugiriendo que animales que logran un mejor desempeño conductual son los que poseen una mayor expresión de BDNF.

ANTECEDENTES

1. Memoria: Conceptos.

Actualmente, se considera que la memoria se forma a partir de procesos temporales y de contenido almacenados en distintos módulos de memoria en base a diferentes estructuras neuronales, que interactúan entre sí, logrando una función de memoria integral. Las distinciones mnémicas pueden ser: *a) temporal*: se resume en: (i) **memoria sensorial**, que almacena la características físicas de los objetos de manera isomórfica por unos pocos milisegundos (Reeves y Sperling, 1986); (ii) la **memoria a corto plazo**, o de trabajo u operativa (Working Memory)¹ de capacidad limitada, fundamental para procesos cognitivos en lenguaje, aprendizaje y razonamiento (Goldman-Rakic, 1992), y que controla el paso de la información hacia la (iii) **memoria a largo plazo**.; *b) contenido*, donde se destacan las distinciones de memoria explícita² v/s implícita³, memoria episódica⁴ v/s semántica⁵ y memoria declarativa⁶ v/s procedimental⁷, dependiendo del paradigma experimental que se aplique. Squire (1992) divide a la memoria en dos grandes sistemas: una memoria no declarativa, definida ésta como una colección heterogénea de habilidades mnémicas implícitas, las cuales se expresan sólo a través del rendimiento (como el aprendizaje no-asociativo, la memoria procedimental

¹ Baddley (1992, 1994) se refiere a la Working Memory como un dispositivo multiunitario, compuesto por una colección de capacidades temporales intrínsecas a los diversos sistemas de procesamiento de la información, que permite mantener ésta mientras está siendo procesada, destacando los roles de la atención, el procesamiento consciente y la capacidad de la memoria.

² Lo que se recuerda conscientemente como una experiencia personal. Información de la cual se tiene conciencia de que se posee.

³ Expresión de información almacenada sin consciencia de su adquisición en el tiempo y/o espacio

⁴ Memoria en donde se almacena experiencia personal y contextual pasada. También llamada memoria biográfica.

⁵ Conocimiento general del mundo Adquisición y retención de información relacionada con la formación de conceptos.

⁶ Habilidad para recordar los detalles de los eventos (incluyendo tiempo, lugar y circunstancias) y los conceptos. También denominada explícita, relacional o configuracional literalmente indica que su contenido puede ser declarado (verbal o no verbalmente),

⁷ Memoria para ciertos modos de hacer algo (hábitos) o para ciertos movimientos (destrezas motoras). Responde principalmente a habilidades no verbales o imposibles de declarar.

y el priming), y contraponiendo a esto, vemos una memoria declarativa, con las características ya vistas anteriormente (Figura 1).

Figura 1

**Sistema de Memoria
(Clasificación según Squire, 1992)**

| No Declarativa | | | Declarativa | |
|-------------------------------|---|---------|------------------------------|--|
| No Asociativa | Procedural | Priming | Semántica (De referencia) | Episódica (De trabajo u operativa) |
| Habitación Sensibilización | Hábitos/ Destrezas Condicionamiento simple | | | |

Teniendo en cuenta los modelos vistos recientemente, podemos ver que la memoria está dividida principalmente por una dimensión no declarativa (o implícita) y otra declarativa, que dependería íntegramente del lóbulo temporal medial (comprendiendo el hipocampo, el giro dentado y el complejo subicular, junto con las cortezas entorrinal, perirrinal y parahipocampal, adyacente al giro parahipocampal) (Squire y Zola-Morgan, 1991). En la memoria declarativa podemos ver que existen dos contenidos mnémicos, que serían las memorias semántica y episódica, definidas según Tulving (1990) como contenidos generales del mundo y como memoria biográfica, respectivamente. Es así como en la memoria episódica se encontraría la memoria de reconocimiento, que es la capacidad de identificar un estímulo, objeto, sujeto o situación como algo ya vivido o visto anteriormente. A su vez, los estudios indican que esta memoria de reconocimiento estaría dividida en dos procesos: Recuerdo (*recollection*) y familiaridad (*familiarity*). El primero almacena detalles contextuales (espaciales) de la situación, con detalles sobre el episodio de aprendizaje, y que dependería del HC, mientras que la segunda almacena la información como un “conocimiento” no detallado (implícito), sin información

sobre el contexto de aprendizaje, y dependería de CPr (Brown y Aggleton, 2001). Esta distinción ha sido apoyada por varios autores por distintas vías (Yonelinas, 2002), ya sea por estudios sobre la rapidez de procesamiento (Hintzman, Caulton, y Levitin, 1998), estudios de confianza de respuestas de reconocimiento (Kelly y Wixted, 2001), por correlatos electrofisiológicos (Klimesch *et al.*, 2001) o por estudios de daño cerebral (Aggleton *et al.*, 2000). Sin embargo, también hay estudios que proponen una mayor cooperación entre HC y CPr, dando a entender que una distinción rígida entre ambas dimensiones no sería correcto, sobre todo porque sus sustratos neuroanatómicos suelen solaparse en diversos paradigmas experimentales (Squire *et al.*, 2007).

2. Tarea de reconocimiento espontáneo de objetos

La memoria de reconocimiento en roedores ha sido estudiada de distintas formas y por múltiples autores, buscando variables que puedan estar subyaciendo a este tipo de memoria. A nivel conductual, y en el caso específico de los roedores, existen diversos tests que ayudan a evaluar el desempeño de animales que poseen diferentes capacidades sensoriales, tales como las olfatorias, táctiles, visuales, etc. Las tareas de reconocimiento de objeto, tienen como característica principal una fase de muestra (FM), en donde al animal se expone al (los) objeto(s), que debe recordar; un intervalo entre fases (IF) para evaluar la duración de la huella mnémica, y una fase de elección (FE) donde el sujeto explora entre dos (o más) objetos familiares o nuevos (Steckler *et al.*, 1998). Dentro de este grupo, Ennaceur y Delacour (1988) introducen el paradigma de la tarea de reconocimiento espontáneo de objetos, o también llamada tarea de reconocimiento de objeto nuevo, como una alternativa a la tarea *Delayed not matching to sample* (DNMS) Como característica principal de este test se encuentra el hecho de que en su protocolo no existe condicionamiento por refuerzo (como lo hace DNMS) ni por castigo, sino que se apela al instinto natural del animal por el objeto nuevo, con lo

que tampoco existe un entrenamiento previo a la tarea (Ennaceur et al 1988, 1997, 2004). Dentro de este contexto, el test se ha utilizado para distintos fines, algunos enfocados en lo conductual, observando variables que puedan causar interferencias en el desempeño (Ennaceur et al, 2004; Okuda et al, 2004; Sik et al, 2003), y otros intentando encontrar correlaciones con distintas áreas cerebrales por medio de daños y drogas, que entre otras cosas, ha servido para delinear la asociación entre este tipo de memoria con la corteza perirrinal y la plasticidad sináptica (Gereth et al, 2008; Wan et al, 2004). Pese a los distintos fines de TREO, todos tienen en común dos cosas: los intervalos entre fases como presunta variable, y el hecho de tomar la discriminación del objeto nuevo como índice de reconocimiento de objeto exitoso. En trabajos preliminares (Aspé y Contreras, 2008, datos no publicados) se encontró que dentro de una muestra de 8 ratas *Sprague dawley* jóvenes no se daba la línea de tendencia esperable tanto para el intervalo entre fases como para la predilección del objeto nuevo, sino que se veía una distribución repartida entre ambos objetos, es decir, habían animales cuya exploración era mayor en el objeto familiar, y otros en el novedoso, con un intervalo entre fases de 1 minuto. De todas formas, ya en los inicios del test se sugería una fuerte variabilidad individual (Ennaceur y Delacour, 1988). Esto se podría deber al no haber un condicionamiento bajo este paradigma (Stackler et al, 1998), lo que sugiere como tema interesante a estudiar la individualidad de los sujetos experimentales, tomando estas variables como formas preliminares, debido a la gran cantidad de variabilidad de los protocolos dependiendo de lo que se desea estudiar (Wan et al, 2004; Warburton et al, 2003; Ennaceur et al, 1988, 2004; Broadbent et al, 2004).

Por último, cabe agregar que ante de la variabilidad de análisis existentes anteriormente mencionada, tomaremos, en el análisis de los datos en la fase de elección, los dos primeros minutos de los tres totales tomados como protocolo, tal y como lo sugieren Dix y Aggleton (1999), quienes refieren que, luego de dos minutos de exploración de la caja y de los objetos en TREO, el animal se

familiariza con el objeto nuevo, con lo que el índice de reconocimiento decrece, al distribuir su tiempo en ambos objetos por igual.

Figura 2

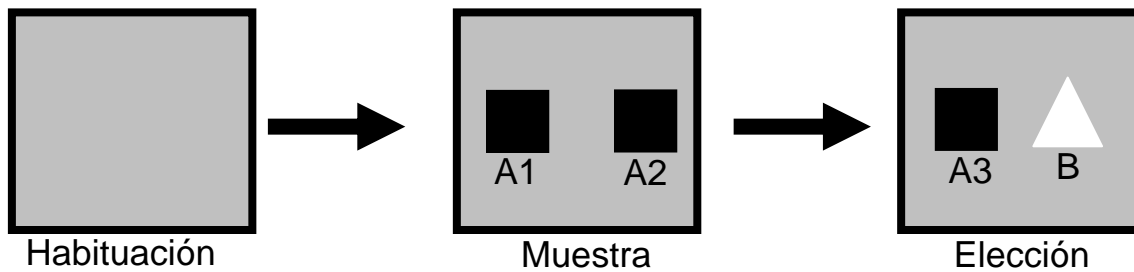


Figura que muestra de forma esquemática TREO. Regularmente la tarea viene precedida por una etapa de habituación que varía en número de sesiones y en cantidad de tiempo expuesto al animal dependiendo de los fines de investigación. Luego, en TREO propiamente tal, al animal se le expone a dos objetos idénticos (A1 y A2) en la fase de muestra por un tiempo determinado, y luego de un cierto intervalo de tiempo en donde el roedor se encuentra fuera de la caja, se le expone nuevamente a dos objetos, en este caso uno idéntico a los anteriores (A3) y uno nuevo (B).

3. Memoria y Plasticidad sináptica.

La plasticidad sináptica (PS) se define como cambios en la eficacia sináptica y en los patrones de conectividad gatillados por la experiencia. Estos cambios se han sido considerados como el sustrato celular de los mecanismos de memoria y aprendizaje, demostrándose recientemente para un tipo particular de memoria dependiente del hipocampo (Whitlock, 2006), que el aprendizaje en la tarea de evitación inhibitoria induce procesos de potenciación a largo plazo (LTP) junto con inducir alteraciones en los estados de fosforilación de los residuos Ser⁸³¹ y Ser⁸⁴⁵ del terminal C en los receptores de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA), las que están involucradas en procesos de LTD y LTP.

La PS de largo término puede manifestarse como depresión a largo plazo (LTD) o como LTP (disminución o aumento de la eficacia sináptica, respectivamente). Ambos procesos involucran una fase temprana (etapa de *inducción*), donde ocurren ciertos eventos como *i*) una actividad coincidente

de las neuronas pre y post sináptica, que permiten la activación de los receptores glutamatérgicos del tipo NMDAR, los cuales permanecen bloqueados por Mg^{2+} hasta la despolarización de la neurona post sináptica y *ii*) la fosforilación y transporte de receptores de AMPA a la membrana. Por otro lado, existe una fase tardía (etapa de *mantenimiento*) la cual es dependiente de la síntesis de proteínas y de factores de transcripción que inducen la transcripción de genes asociados a PS (Kandel, 2001).

4. Corteza perirrinal.

La CPr, que está constituida por las áreas corticales que rodean el surco rinal (i.e., 35 y 36 de Brodmann), está ubicada lateral a la formación hipocampal y medial anterior a la corteza inferotemporal anterior (área TE, Burwell, 2001). La CPr recibe aferencias desde toda la corteza sensorial, siendo parte de la red jerárquicamente organizada del lóbulo temporal medial, donde junto con las cortezas entorrinal y parahipocampal, actúa como integradora de las entradas uni y poli-modales desde las áreas sensoriales adyacentes (principalmente, cortezas asociativas de baja especificidad modal), formando asas de retroalimentación entre las proyecciones aferentes hacia la neocorteza y las eferencias recíprocas desde ésta (Lavenex y Amaral, 2000). Las aferencias desde áreas corticales de información sensorial le permiten mantener una representación de los objetos como entidades (Brown y Bashir, 2002; Bussey *et al.*, 2005), a diferencia de las representaciones a partir de dimensiones aisladas de las etapas anteriores de procesamiento, constituyendo una estación de relevo a la mayor parte de las vías hacia el sistema hipocampal-entorrinal (Shi y Cassell, 1999).

El papel de la CPr en la discriminación de familiaridad dentro de los procesos de memoria de reconocimiento se ha establecido mediante estudios de ablación, apreciándose que en esta condición las ratas presentan un severo déficit de discriminación en tareas tales como el *delayed matching* y *non-matching to sample* (Brown y Aggleton, 2001). Asimismo, los diferentes papeles de la CPr y el

HC en la memoria de reconocimiento han sido esclarecidos en algunos trabajos (Wan *et al.* 1998), donde mediante procedimientos de vista pareada (Brown y Aggleton, 2001), y utilizando inmunohistoquímica para el gen temprano c-fos, se mostró que la CPr se activa ante la presentación de objetos individuales nuevos (no mostrando actividad ante objetos individuales familiares), mientras que el HC se activa ante arreglos novedosos de objetos individuales, más que ante arreglos familiares de objetos. Por otra parte, la actividad en la CPr señala la novedad de un estímulo, volviendo a su actividad basal a medida que el objeto se torna familiar; el HC en cambio, es más susceptible de responder ante los estímulos familiares, a veces incrementando y otras veces disminuyendo su respuesta respecto a su actividad basal. De todas formas, probablemente ambas estructuras trabajan de modo solapado, y los resultados obtenidos en la bibliografía correspondan a diferencias en la *fuerza* de la huella mnémica más que a roles excluyentes (Squiere *et al.*, 2007).

Habiéndose establecido que la disminución de respuesta funciona como código de previa ocurrencia a nivel de la CPr, los estudios sugieren que ésta disminución de respuesta difiere de la simple habituación (ya que se aprecia incluso cuando el animal está obteniendo algún refuerzo), y que representa, en comparación al incremento de respuesta, una economía neural por tres razones: i) es más relevante para el organismo enfocar su atención a lo novedoso en vez de a lo familiar, ii), un estímulo novedoso requiere más procesamiento que uno familiar, y iii), en la cotidianidad es más probable encontrarse con un estímulo familiar que con uno novedoso (Brown, 1996).

Entre los mecanismos putativos de disminución de respuesta en la CPr, no se ha establecido apoyo experimental ni para la proliferación de interneuronas inhibitorias ni para la generación de depresión sináptica: sí existe evidencia del papel de la LTD homosináptica en la disminución de respuesta (Brown y Xiang, 1998). Estimulando mediante el protocolo “low-frequency stimulation” (LFS) en las capas II/III y registrando potenciales de campo evocados en capa I, se ha obtenido un

LTD que vuelve a su línea base al cabo de 1 hora, mientras que la estimulación y registro en capa II/III mediante LFS se mantiene estable por varias horas (Ziakopoulos et al, 1999).

5. Epigenética

El término *epigenética* alude a modificaciones post-transcripcionales y auto-perpetuantes tanto en el ADN como en el conjunto de proteínas nucleares, que no involucran cambios en la secuencia de nucleótidos del ADN (Levenson *et al.*, 2006). Estas modificaciones alteran la arquitectura nucleoproteica, haciendo más o menos viable el trabajo de la maquinaria molecular de transcripción, lo que permite la activación o silenciamiento de la expresión génica (Wade, 2004).

Diversos estudios han mostrado que la enzima histona acetiltransferasa (HAT) tiene un importante rol en los procesos epigenéticos: al acetilar el grupo ϵ -amino de los residuos de lisina en las histonas, provoca que éstas se separen de la molécula de ADN, lo que permite la interacción entre la ARN-polimerasa II y la hebra de ADN y torna plausible el inicio del proceso de transcripción (Turner, 2002). Otros estudios han evidenciado el papel de la enzima ADN (citosina-5') metiltransferasa (DNMT), la cual agrega un grupo metilo en el carbono 5 de la citosina en dinucleótidos CpG, formando una 5'-metilcitosina, específicamente en los segmentos de ADN denominados "islas CpG" (Miller y Sweatt, 2007). Estas zonas, presentes en los genes, están constituidas por entre 300 y 3000 pares de base (pb) y mantienen una alta proporción de CpG (>55%), mayor a la esperable por azar (razón CpG observado/esperado >0.65). La metilación de CpG se traduce en silenciamiento génico por la acción de proteínas de unión a CpG metilado, como la proteína de unión a CpG metilado (MeCP2), involucrada en la regulación transcripcional de BDNF (Wade, 2004), lo que se ha sugerido como un mecanismo putativo de remodelamiento de la cromatina por la HAT.

Los mecanismos epigenéticos participan en la diferenciación celular, la inactivación del cromosoma X y el silenciamiento génico, consolidando una forma de “memoria” que perpetúa los fenotipos celulares. La metilación del ADN procura que cada célula “recuerde” su patrón de expresión génica una vez que se ha diferenciado (Miller y Sweatt, 2007). Por esto, es esperable que las concentraciones de DNMT sean altas durante el desarrollo temprano, y que disminuyan al finalizar la diferenciación celular. Por otro lado, existen estudios que revelan una alta concentración de ARNm de la DNMTs en el sistema nervioso central (SNC) adulto, habiéndose descrito también una alta actividad enzimática (Levenson *et al.* 2004). Más aún, han evidenciado que existen cambios en los patrones de acetilación de histonas en HC de ratas adultas, los cuales son gatillados por la tarea de condicionamiento contextual al miedo. Estos mismos autores demostraron que la metilación de CpG es otro mecanismo epigenético que el SNC utiliza para almacenar la información a largo plazo, apoyándose en evidencia empírica que muestra que la despolarización neuronal correlaciona con una disminución en el estado de metilación de los promotores de BDNF-III y BDNF-IV en ratas y ratones, respectivamente (Chen *et al.*, 2003; Martinowich *et al.*, 2003).

6. BDNF y plasticidad sináptica

Las neurotrofinas son factores de crecimiento que regulan la diferenciación, supervivencia, crecimiento y capacidades funcionales de poblaciones específicas de neuronas. Dentro de la familia de las neurotrofinas encontramos el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el factor de crecimiento nervioso (NGF) y las neurotrofinas 3 (NT-3), 4/5 (NT-4/5), 6 (NT-6) y 7 (NT-7), las cuales presentan una estructura tridimensional larga y un nudo de cisteína característico, otorgado por uno de sus tres enlaces disulfuro (Gómez-Palacio y Escobar-Rodríguez, 2007).

BDNF es sintetizado como una neurotrofina precursora (proBDNF), la cual tiene un peso molecular aproximado de 35 kDa y es procesada tanto intracelular como extracelularmente por proteasas que configuran su estructura madura (mBDNF), la cual tiene un peso aproximado de 13 kDa. De este modo, puede secretarse tanto en sus formas precursoras como maduras, y tanto a través de vías reguladas como constitutivas (Lu *et al.*, 2005). Cada mBDNF constituye una estructura dimérica con un mBDNF gemelo (27 kDa), la que interactúa con un receptor de tirosinacinas (Trk), mientras que proBDNF interactúa con el receptor $p75^{\text{NTR}}$, de alta afinidad con la forma precursora de la proteína (Lu *et al.*, 2005). Los receptores Trk se han clasificado en TrkA, activado principalmente por NGF, TrkB, de mayor afinidad con BDNF y NT-4, y TrkC, el cual interactúa preferentemente con NT-3 (Gómez-Palacio y Escobar-Rodríguez, 2007). Se ha demostrado que la interacción neurotrofina-Trk está relacionada con procesos de supervivencia celular y LTP, mientras que la activación de los receptores $p75^{\text{NTR}}$ por los precursores de neurotrofina se relaciona con apoptosis y LTD (Lu *et al.*, 2005). Específicamente, mBDNF/TrkB induce LTP tanto en su fase temprana mediante el aumento de conductancias iónicas y la fosforilación y transporte de proteínas de membrana, como AMPAR (Bramham y Messaoudi, 2005), como en su fase tardía, principalmente mediante la activación de la vía de transducción de señales de proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK), la cual i) fosforila el factor de iniciación eucariótico 4E (eIF4E), aumentando por ejemplo la traducción de proteínas asociadas al citoesqueleto reguladas por actividad (Arc) (Bramham y Messaoudi, 2005), y ii) activa el elemento de unión responsivo a adenosina monofosfato cíclica (CREB) (Gómez-Palacio y Escobar-Rodríguez, 2007). Además se ha evidenciado que la interacción proBDNF/ $p75^{\text{NTR}}$ -sortilina induce muerte celular programada (Teng, 2005) y que proBDNF/ $p75^{\text{NTR}}$ está implicada en procesos de LTD dependientes de NMDA al sobre regular la expresión de la sub-unidad NR2B (Woo, 2005).

A nivel de CPr, se han evidenciado cambios en la estructura sináptica gatillados por pruebas de reconocimiento de objetos, específicamente TREO (Aicardi *et al.*, 2006). Siendo BDNF una neurotrofina implicada en procesos de sinaptogénesis, es esperable que patrones dinámicos de secreción de BDNF subyazcan a éstos cambios arquitectónicos dependientes de actividad. En esta línea, Aicardi *et al.* (2004) han mostrado, mediante técnicas electrofisiológicas e inmunohistoquímicas, que en CPr de ratones la LTP inducida por TBS se corresponde con aumentos significativos en los niveles basales de secreción de BDNF, mientras que la LTD inducida por LFS induce una reducción en la secreción de BDNF, la que retorna a sus niveles basales a los pocos minutos.

HIPÓTESIS

La memoria de reconocimiento de objetos en ratas *Sprague dawley*, independiente si se trata de una preferencia por el objeto familiar o novedoso, se correlaciona con el estado de metilación del exón I del gen de BDNF y con la concentración de BDNF en la corteza perirrinal.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el estado de metilación del exón I del gen de BDNF y la concentración de BDNF en la corteza perirrinal de ratas *Sprague dawley* con los distintos rendimientos |D2| en TREO.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Someter a una muestra de ratas *Sprague dawley* a tres sesiones de TREO.
 - a. Identificar el intervalo entre fases (1 minuto, 3 horas o 24 horas) en el cual la muestra da cuenta de un mayor índice de reconocimiento [D2].
 - b. Identificar el desempeño promedio en las tres sesiones para cada una de las ratas del grupo con mayor índice de reconocimiento [D2].
2. Microdisecar las CPr's de las ratas del grupo con mayor índice de reconocimiento [D2], para su posterior análisis biomolecular y bioquímico.
3. Analizar el estado de metilación del exón I del gen de BDNF de la corteza perirrinal para cada una de las ratas.
 - a. Aislar ADN genómico de las cortezas microdisectadas.
 - b. Modificar el ADN genómico con bisulfito de sodio, convirtiendo las citosinas que no están metiladas a uracilos mediante una reacción de deaminación, manteniendo intactas las 5-metilcitosinas.
 - c. Detectar cambios en el estado de metilación en el promotor de BDNF, utilizando PCR sensible a metilación.
4. Analizar las concentraciones de BDNF en la corteza perirrinal para cada una de las ratas.
 - a. Aislar proteínas de las zonas microdisectadas.
 - b. Cargar 30 μ g de proteínas por cada zona microdisectada en geles al 12% para efectuar electroforesis.
 - c. Incubar membranas obtenidas en la transferencia de los geles con anti BDNF como anticuerpo primario para distinguir la proteína a estudiar.

- d. Detectar cambios en la concentración de BDNF de las distintas zonas microdisectadas.
5. Correlacionar tanto el estado de metilación del exón I del gen de BDNF como la concentración de BDNF en la corteza perirrinal con el rendimiento [D2] de las ratas *Sprague dawley* en TREO.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Sujetos.

Se utilizaron 39 ratas *Sprague dawley* machos de edades que oscilan entre los 20 días y un mes de vida. Los sujetos fueron cuidados dentro de las dependencias de la Universidad de Valparaíso, específicamente en la Facultad de Ciencias, en una sala de cuarentena preparada para estos objetivos. Los animales se mantienen en un ciclo de luz-oscuridad de 12-12 hrs, y tanto el alimento como el agua les fue dado *ad-libitum*. Fueron separados en 5 individuos por jaula (excepción de una jaula que contaba con 4 animales).

Para respetar el ciclo circadianos de los sujetos, las sesiones de TREO fueron realizadas en horas que oscilan entre las 10 am, y las 13 pm dependiendo del grupo experimental.

Se buscó minimizar el sufrimiento y el número de ratas utilizadas en el presente estudio.

2. TREO.

Se utiliza el protocolo introducido por Ennaceur y Delacour (1988), y sus modificaciones posteriores (Ennaceur et al, 1996, 1997), y modificaciones propias para el presente estudio experimental. Las sesiones se realizaron en un laboratorio conductual acondicionado para tales propósitos (luz y temperatura apropiada, con ruido blanco constante).

a. Aparatos

El aparato consiste en una caja negra de polietileno (65 x 50 x 50 cms.), con una iluminación dada por dos tubos fluorescentes de 18 watts cada uno, que dan 288 lux a nivel del piso de la arena.

Se utilizaron triplicados de objetos tridimensionales de plástico, loza y greda, de diversos tamaños, formas y colores, con un peso que asegurara que el animal no pudiera moverlos al

explorarlo. Para evitar señales odoríferas, tanto los objetos como la arena experimental, luego de una sesión, eran limpiados con ETOH al 70%.

b. Procedimiento

Todos los animales (excepto el grupo 1 en el experimento 2 – ver más adelante) previo a la realización del test, fueron sometidos inicialmente a la exploración de la caja vacía (sin ningún objeto) por 15 minutos, con sesiones variables dependiendo de la condición experimental, con el fin de que los sujetos se habituaran tanto al aparato experimental, como al laboratorio conductual. Asimismo, para cada sesión, tanto de habituación como de TREO, los sujetos estuvieron en el laboratorio por una hora en sus jaulas sin realizar actividad alguna, para así disminuir la ansiedad propia de un cambio de ambiente y facilitar la habituación al laboratorio.

Al día posterior a la última sesión de habituación, los sujetos son sometidos a TREO (grupos A, B, C y 3). Todos los individuos fueron sometidos a 3 sesiones de TREO consecutivas. Los animales, primeramente, pasan por una fase de muestra, en donde ingresan a la caja y son expuestos a dos objetos idénticos (A1 y A2) por tres minutos. Luego de esta fase de muestra, los animales son devueltos nuevamente a su caja de descanso. En ese momento, el experimentador se encarga de limpiar la arena y remover los objetos. Después de un intervalo de tiempo (de 1 minuto, de 3 horas o de 24 horas, dependiendo de la condición experimental), el animal pasa por una fase de elección, donde vuelve a la caja y es expuesto nuevamente a un par de objetos, pero esta vez correspondiente a un objeto idéntico a los de la fase de muestra (A3), y otro nuevo (B). El tiempo de la fase de elección son otros tres minutos.

Para las fases de elección de las 3 sesiones de TREO, y para todos los sujetos experimentales, la disposición de los objetos fue la siguiente:

| | | | |
|-----------|----|---|----|
| Sesión 1: | A3 | – | B |
| Sesión 2: | B | – | A3 |
| Sesión 3: | A3 | – | B |

Con esto se pretende no predisponer al animal a una ubicación específica del B. Cabe aclarar que para cada sesión de TREO se utilizaron objetos distintos, pero cada sujeto se enfrentó a los mismos objetos, para así evitar sesgos por parte de características propias del objeto en cuestión.

Tanto las sesiones de habituación como de TREO, fueron grabadas por una video cámara suspendida sobre la arena y conectada a un computador para su posterior análisis.

c. Análisis

Se toma como exploración significativa aquella en donde el animal se acerca activamente a un objeto y su cabeza se encuentra del objeto a menos de dos centímetros de distancia (Ennaceur et al, 1988, 1997). No se considera exploración cuando el animal se acerca con otra parte del cuerpo al objeto ni cuando se sube sobre éste.

Los índices utilizados fueron los siguientes (A1, A2, A3 y B son los tiempos exploración por cada objeto respectivo):

E1: Tiempo de exploración de FM ($A1+A2$)

E2: Tiempo de exploración de FE ($A3 + B$)

A3%: Porcentaje de exploración objeto familiar ($[A3*100]/ [A3+B]$)

B%: Porcentaje de exploración objeto nuevo ($[B*100]/ [A3+B]$)

D2: Índice de discriminación relativa ($[B - A] / [B + A]$).

|D2|: Valor absoluto de D2.

El índice $|D2|$ nos permite tomar tanto el reconocimiento familiar como novedoso como índice de reconocimiento exitoso de los objetos expuestos. Se toma como índice de reconocimiento exitoso un D2 de 0.2 (un 60% de exploración ya sea de A1 o B sobre la exploración total)⁸.

Se tomarán los primeros dos minutos de exploración en la FE para analizar (Dix y Aggleton, 1999) y tomar los índices expresados anteriormente.

Experimento 1

15 ratas *Sprague dawley* machos de entre 20 días y un mes de edad con los mismos cuidados descritos anteriormente. Son divididos en tres jaulas con 5 ratas cada una, que corresponden a tres grupos experimentales distintos. Los grupos serán divididos en Grupo 1, Grupo 2 y Grupo 3 haciendo la diferencia entre ellos el intervalo que exista entre la fase de muestra y la fase de elección. Estas fases tendrán el mismo protocolo de tiempo para todos los grupos (3 minutos). La división de los distintos IF por grupo será la siguiente:

Grupo 1: Fase de muestra : 3 minutos

Delay : 1 minuto

Fase de elección: 3 minutos

Grupo 2: Fase de muestra : 3 minutos

Delay : 3 horas

Fase de elección: 3 minutos

⁸ Este índice surge al promediar los tiempos de exploración de A1 y A2 de toda la muestra de animales, sumando el error muestral correspondiente. Esto se basa en que al ser la fase de muestra una exposición de dos objetos idénticos, lo esperable por azar es que la distribución del tiempo de exploración de un objeto y otro debiera tender al 50% del tiempo de exploración total (o a un D2 de 0), sin una preferencia marcada (Aspé y Contreras 2008, datos no publicados).

Grupo 3: Fase de muestra : 3 minutos

Delay : 24 horas

Fase de elección: 3 minutos

Cada grupo tendrá dos sesiones de habituación antes de enfrentarse a TREO, distribuidas en dos días consecutivos respectivamente. Luego de estas dos sesiones, se procederá a tomar el TREO al día siguiente. Esta prueba conductual se repetirá por 3 sesiones en los 3 grupos experimentales. Cabe agregar que tanto en las sesiones de habituación como en las de TREO, a los sujetos se les llevará una hora antes de efectuar las pruebas al laboratorio conductual, donde se le pondrá un ruido blanco de fondo. Esto tiene como fin la habituación de parte de las ratas al laboratorio donde se efectuarán las pruebas.

Experimento 2

24 ratas *Sprague dawley* machos de entre 20 días y un mes de edad con los mismos cuidados descritos en el apartado “Sujetos”. Son divididos en 5 jaulas distintas, teniendo en 4 de ellas cinco animales por jaula, mientras que en una se encuentran sólo 4 sujetos. Los grupos son divididos en 1, 2 y 3, siendo los primeros dos grupos controles, y el grupo 3 experimental. Los primeros dos grupos se encuentran dispuestos en una jaula por grupo, mientras que el grupo 3 se encuentra disperso en 3 jaulas distintas de 5 individuos por cada una. Los grupos estarán sometidos a distintas condiciones experimentales dependiendo de cuál sea éste:

Grupo 1 G1 (n=5): Se disecta después de estar 2 días en sala de cuarentena y sin pasar por ninguna tarea conductual, ni tampoco visitar el laboratorio conductual.

Grupo 2 G2 (n=4): Pasan por 3 sesiones de habituación, pero sin ser expuestos a TREO.

Grupo 3 G3 (n=15): Pasan tanto por 3 sesiones de habituación como 3 sesiones de TREO. El intervalo entre fases corresponde a 3 horas en este último.

Las 3 sesiones de habituación tanto para el grupo 2 como el 3 serán distribuidas en tres días consecutivos. TREO se iniciará al día posterior de haber terminado la última sesión de habituación.

3. Microdissección de CPr.

Los cerebros de ratas machos *Sprague dawley* de 20 días serán removidos y bañados continuamente por una solución salina de corte (sacarosa: 212,7 mM; KCl, 3 mM, NaH₂PO₄, 1.25 mM; NaHCO₃, 26 mM; D-glucosa, 10 mM; CaCl₂, 0.5 mM; MgCl₂, 10 mM; 95% O₂, 5% CO₂; 4 °C). Se aislará CPr, y se destinarán al azar 10 muestras para el protocolo PCR y otras 10 muestras para Western Blott (manteniéndose ciegos los experimentadores, para asegurar la objetividad en el procedimiento), las que inmediatamente serán guardadas en un Eppendorf de 1.5 mL y sumergidas en nitrógeno líquido para su posterior almacenamiento a -80 °C.

4. Aislamiento ADN genómico y PCR específico para metilación.

a. Aislamiento del DNA genómico

Mediante Kit Wizard® Genomic DNA Purification de Promega, cuyo procedimiento consiste en i) rompimiento del tejido de CPr con un homogenizador, dentro de una solución de lisis de núcleo, ii) digestión del ARN presente en la solución mediante ARNasas, iii) remoción de las proteínas celulares por solución de precipitación de proteínas y centrifugado, y iv) precipitación del ADN genómico con isopropanol y lavado con una solución de etanol 70%. El ADN es rehidratado en 30 µL de buffer TE 1x, para su posterior cuantificación y modificación con bisulfito de sodio.

b. Modificación del ADN genómico con bisulfito de sodio.

Mediante un proceso de deaminación, el bisulfito de sodio convierte las citosinas no metiladas en uracilos, manteniendo intactas las 5-metilcitosinas, permitiendo el diseño de partidores para la reacción de PCR específico para estudios de metilación (Clark *et al.*, 2006).

El procedimiento ha sido ligeramente modificado para adaptarlo a las cantidades de tejido obtenidas de CPR. Éste consiste en i) tomar 25 μ L de ADN en buffer TE, ii) denaturar el ADN agregando 2,5 μ l de NaOH 3M e incubando esta solución a 42 °C por 30 minutos, iii) añadir 255 μ l de bisulfito de sodio (3.9 M, pH 5), 15 μ l hidroquinona (10mM, como alcalizante que previene la rotura de las hebras de ADN durante la depurización) y 2.5 μ l de agua nanopura, para completar un volumen de 300 μ L, y iv) incubar la solución a 55 °C durante 16 hrs.

c. Purificación del ADN

Mediante Kit Wizard® Clean-Up de Promega, según instrucciones del fabricante, sistema basado en la capacidad del ADN para unirse a las membranas de sílice en presencia de sales caotrópicas, para luego ser eluido con agua libre de nucleasas.

d. Ensayo de metilación por PCR en el promotor de BDNF.

El ADN aislado, modificado con bisulfito y purificado será usado como templado para realizar PCR específica para el estado de metilación (Clark *et al.*, 2006) del promotor del exón I del gen de BDNF. Se utilizarán un par de partidores diseñados usando Methpartidor® software (www.urogene.org/methpartidor/), los cuales fueron diseñados para reconocer la isla de CpG 1. Los partidores son:

Forward (5'-GTAGCGATTTTGGGGAGGAAGTAC-3')

Reverse (5'-CAACCTCTATACGCGACTAAATCCG-3').

Las muestras serán normalizadas con β -Tubulina-IV, usando los siguientes partidores:

Forward (5'-GGAGAGTAATATGAATGATTTGGTG-3')

Reverse (5'-CATCTCCAACCTTCCCTAACCTACTTAA-3').

Las PCR serán realizadas en un volumen total de 20 μ L:

10 μ L de Go-Taq Green Master Mix®, de Promega

1 μ L de Partidor forward

1 μ L de Partidor reverse

20 ng de ADN modificado

Agua libre de nucleasa (hasta completar los 20 μ L).

Cada reacción se amplificará por termociclado mediante el siguiente protocolo:

3 min a 95 °C (1x)

15 seg a 95 °C; 1 min a 58,9 °C; 30 seg a 72 °C (40x)

5 min a 72 °C (1x)

16 °C.

De cada reacción amplificada se cargarán 2 μ L en gel de agarosa al 2% para su posterior electroforesis.

5. Western Blot

Microdisecciones CPr de rata serán microdisectadas y homogenizadas en una solución de lisis (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, NaF 50 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Na₂P₂O₇ 10 mM y dilución 1X de una mezcla de inhibidores de fosfatasa compuesto de cantharidina, bromotetramisole, microcistina LR, ortovanadato de sodio, molibdato de sodio, tartrato de sodio e imidazol). La

concentración total de proteínas será determinada por el método de Bradford. Se cargarán cantidades equivalentes de proteína en un gel al 12% de poliacrilamida al 30%(SDS-PAGE). Una vez separadas las proteínas se electro-transfirieron a una membrana de Immobilon-P (Millipore), que será bloqueada durante una hora a temperatura ambiente con una solución de bloqueo: IBlock 0,02% en solución compuesta de Tris-HCl pH 7, NaCl 150 mM y 0,05% Tween-20 (T-TBS). La incubación con el anticuerpo primario contra la proteína BDNF y se realizará durante dos horas a temperatura ambiente o bien toda la noche a 4°C. Las membranas se lavarán tres veces durante 10 minutos en cada lavado con T-TBS, para luego incubar durante una hora el anticuerpo secundario policlonal (anti rabbit 1:2000). Se revelará usando un método quimioluminiscente (ECL). Las membranas serán reensayadas con un anticuerpo primario anti actina, y anticuerpo secundario secundario (anti mouse 1:2000).

RESULTADOS

1. Conducta

a. Experimento 1

Si tomamos como índice de reconocimiento el D2 con el que la literatura analiza los datos obtenidos de TREO, tenemos que dentro de los tres grupos, promediando el desempeño de los animales en sus tres sesiones, hay muy pocos que alcanzan un nivel que supere el 0.2 que se toma como un reconocimiento exitoso, alcanzando a sólo un sujeto por cada grupo (0.32, 0.36, 0.22 respectivamente (*Gráfico 1*). Es más, si se promedian los desempeños de todos los animales en todas las sesiones, separando a estos por grupo con distintos intervalos, se tiene que ningún grupo logra un nivel significativo de reconocimiento, dejando a cada grupo muy cercano del otro con respecto a su desempeño en TREO (0.08, -0.08, -0.02, *Gráfico 2*).

Gráfico 1

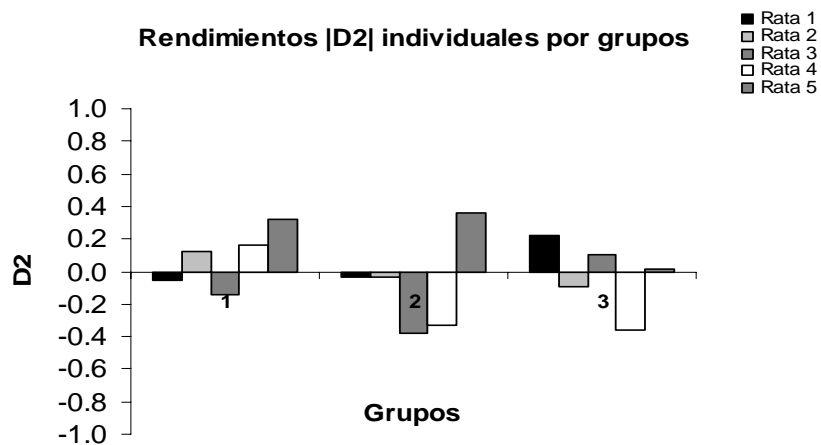


Gráfico de rendimiento D2 individuales por grupos, promediando las 3 sesiones por sujeto. Sólo un sujeto por cada grupo logra alcanzar el índice de reconocimiento significativo.

Gráfico 2.

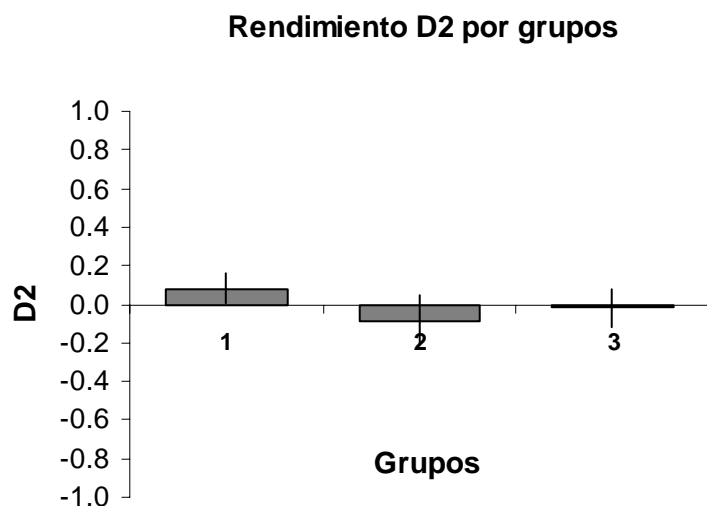


Gráfico de rendimiento D2 por grupo, promediando los rendimientos de todos los sujetos en TREO. Ninguno de los grupos alcanza un nivel óptimo de reconocimiento.

A diferencia de lo anterior, si tomamos como índice de reconocimiento el $|D2|$, tomando como reconocimiento de objeto la predilección por cualquiera de los objetos (ya sea A3 o B), vemos diferencias más claras tanto en el desempeño individual como grupal. Así, vemos que existe una mayor cantidad de animales superando el nivel de reconocimiento exitoso sin importar el grupo. Si nos vamos al detalle, podemos observar que el grupo que tiene más animales superando el límite 0.2 es el grupo con 3 horas de intervalo, con 4 sujetos (0.7, 0.38, 1.0, y 0.4). Este es seguido por el grupo de 1 minuto (n=3, con 0.27, 0.52 y 0.37), y por último, aquel que cuenta con 24 horas de intervalo entre fases (n=2, con 0.44 y 0.36, Gráfico 3).

Gráfico 3.

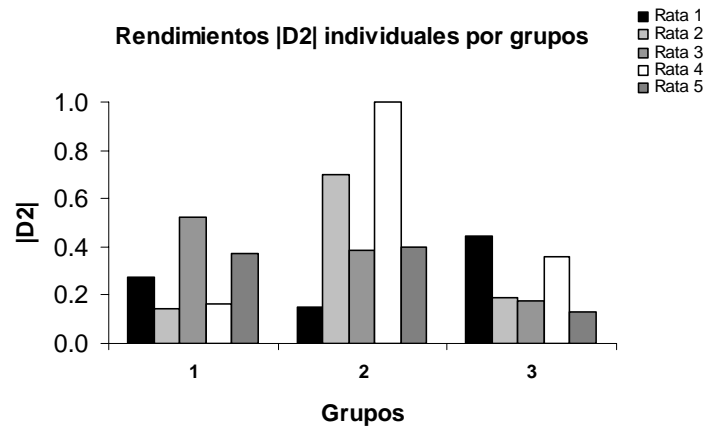


Gráfico de rendimiento |D2| individuales por grupos, promediando las 3 sesiones por sujeto. Se observa una mayor variabilidad individual dentro de un mismo grupo, encontrándose tanto sujetos que alcanzan el |D2| significativo como otros que no, sin importar el intervalo interfases

Asimismo, podemos ver ya a nivel grupal, que aquél que cuenta con 3 horas de intervalo tiene un mayor nivel de reconocimiento (0.53), tomando el promedio de todos los animales en todas sus sesiones. Así también se observa que aún existe reconocimiento a las 24 horas de intervalo, pero muy cercano al límite de 0.2 (0.26) (Gráfico 4).

Gráfico 4.

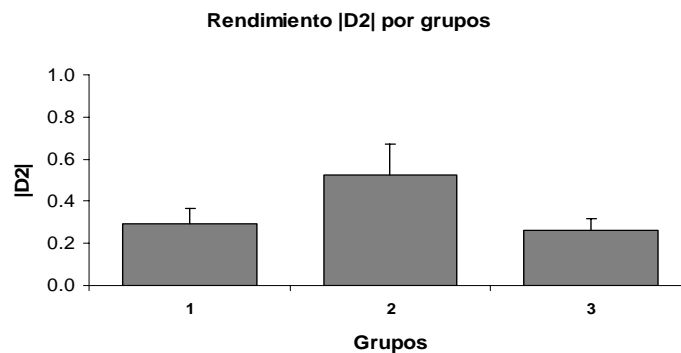


Gráfico de rendimiento |D2| por grupo, promediando los rendimientos de todos los sujetos en TREO. Todos los grupos alcanzan un nivel significativo de reconocimiento, pero con diferencias intergrupales.

Todo esto sugiere que el $|D2|$ es un mejor índice de reconocimiento, pues distingue tanto a los grupos como a los individuos con una mayor variabilidad entre estos, y dando cuenta que los animales sí reconocen. También nos entrega información sobre los intervalos, que en este caso arroja que el intervalo de 3 horas tiene una mayor cantidad de individuos superando el 0.2 $|D2|$ promediando sus sesiones, y que, a su vez, como grupo, supera a los otros con distintos intervalos tomando en cuenta el mismo índice.

Por esto, para el experimento 2, se tomó este intervalo, ya que cuenta con un mayor índice de reconocimiento.

b. Experimento 2

Al igual que en el experimento 1, se sigue dando la misma tendencia tanto a nivel grupal como individual. En el partidor caso, vemos que el rendimiento D2 de la muestra es muy cercano a 0 ($D2=0.02$), lo que sugeriría un nulo reconocimiento por parte de esta (*gráfico 7*). Y si atendemos al promedio de las tres sesiones de TREO de cada uno de los animales, vemos que sólo 2 sujetos logran superar un D2 de 0.2 (0.33 y 0.37), mientras que los otros 13 están bajo este número (*gráfico 5*).

En cambio, con el índice $|D2|$, vemos que el nivel grupal alcanza un nivel de reconocimiento superior al 0.5 (0.51), superando por gran margen al índice de reconocimiento exitoso (figura 9). Y esto se condice con el hecho de que sólo dos sujetos no superan este índice, promediando sus desempeños en las distintas sesiones de TREO (*gráfico 6*).

Gráfico 5.

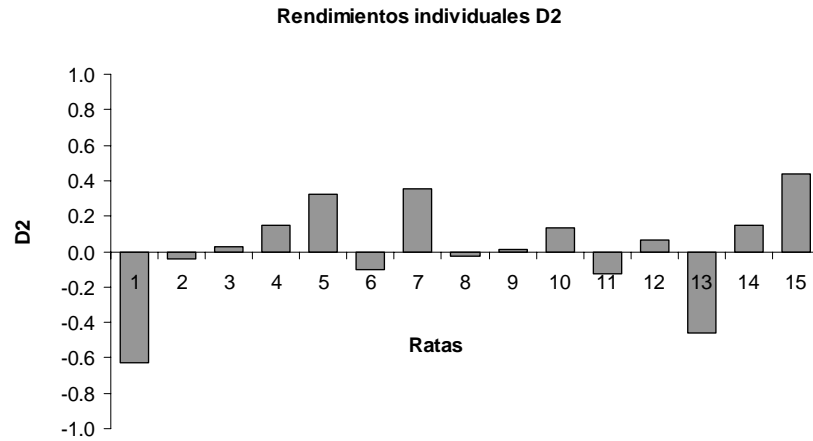


Gráfico de rendimientos individuales D2 en TREO en el grupo 3 (experimental), promediando sus tres sesiones. Sólo tres sujetos alcanzan un nivel significativo de D2.

Gráfico 6.

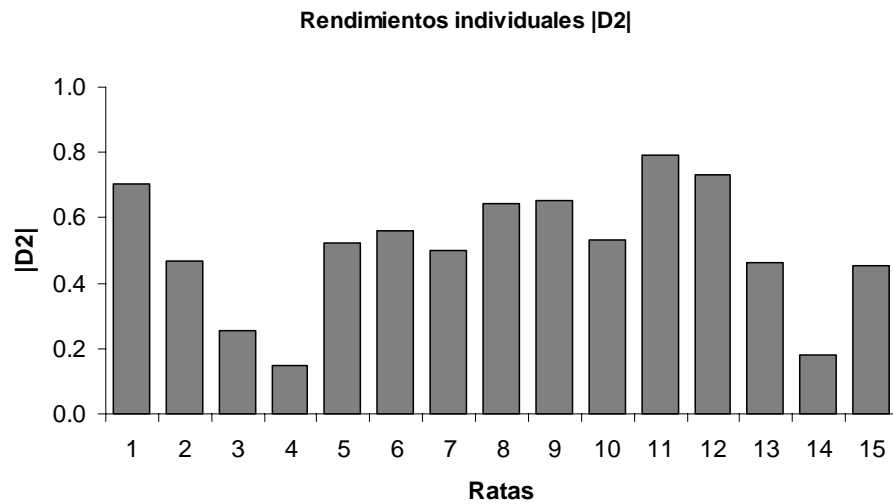


Gráfico de rendimientos individuales $|D2|$ en TREO en el grupo 3 (experimental), promediando sus tres sesiones. La gran mayoría de los sujetos logra un reconocimiento significativo.

Gráfico 7.

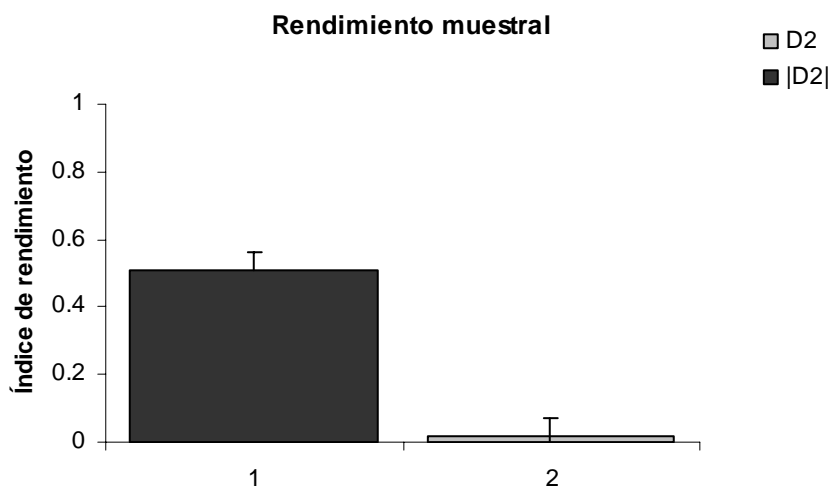
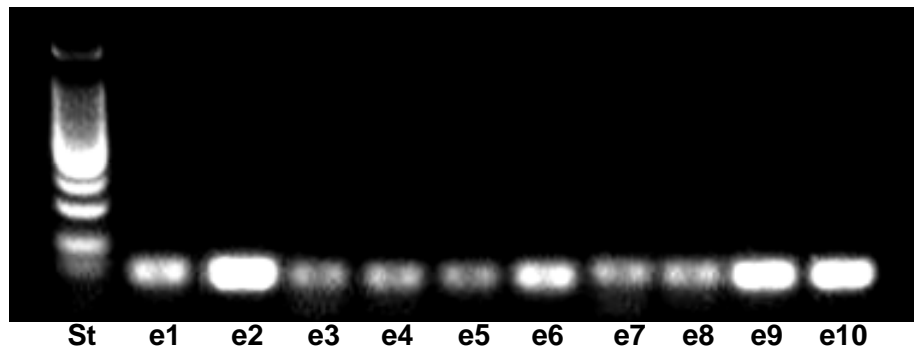


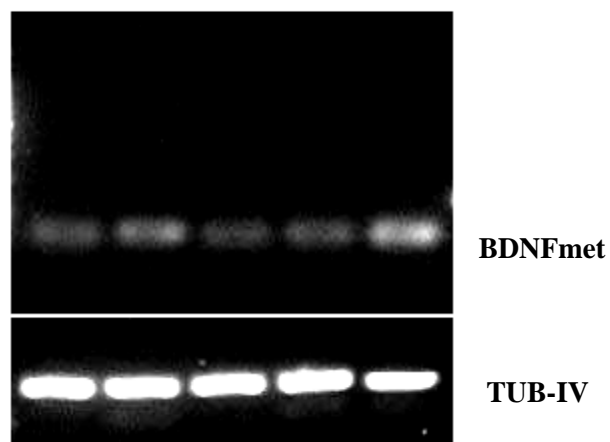
Gráfico de índice de reconocimiento D2 y $|D2|$ para el grupo 3 (experimental), promediando los rendimientos individuales de los sujetos. Analizando los datos con $|D2|$ el grupo logra un alto índice de reconocimiento. El análisis con D2, arroja un resultado cercano a 0.

2. Biología molecular

Luego del protocolo de PCR específica para metilación y la electroforesis, se obtuvieron las marcas respectivas en el gel de agarosa al 2% (*Figura 3*). Las intensidades fueron cuantificadas mediante el software ImageJ ® y normalizadas mediante el control de carga TUB-IV (*Figura 4*), el cual indica si para cada una de las reacciones PCR se cargó la misma cantidad de ADN modificado. El resultado de las cuantificaciones para cada una de las ratas experimentales ($n = 10$), junto con su respectivo rendimiento en TREO, se muestra en la *Tabla 1*.

Figura 3.

Muestra representativa de las intensidades obtenidas en el gel de agarosa al 2%, observándose un estándar de peso molecular (a la izquierda) y diez marcas de las reacciones cargadas con partidores para BDNF metilado, cada una de ellas correspondiente a una rata del grupo experimental (n = 10).

Figura 4.

Marcas para BDNF metilado y TUB-IV representativas de 5 ratas.

Tabla 1.

| Grupo Experimental | | |
|---------------------------|----------------|-------------|
| Rata | BDNFmet | D2 |
| e1 | 4.717983 | 0.47 |
| e2 | 7.428225 | 0.15 |
| e3 | 4.463054 | 0.52 |
| e4 | 4.121861 | 0.56 |
| e5 | 4.260140 | 0.50 |
| e6 | 5.098569 | 0.64 |
| e7 | 4.344690 | 0.65 |
| e8 | 4.010632 | 0.79 |
| e9 | 6.001264 | 0.46 |
| e10 | 5.990033 | 0.45 |
| Promedio | 5.044 | 0.520 |
| StD | 1.104 | 0.169 |
| SEM | 0.349 | 0.053 |

$$r = -0.819619$$

El análisis estadístico nos entrega un coeficiente de Pearson de -0,8196, por lo que los resultados sugieren que existe una relación significativa entre el estado de metilación del exón I del gen de BDNF en CPr y el rendimiento |D2| de la muestra de ratas *Sprague dawley* en TREO. Asimismo, la correlación negativa nos indica que las ratas con mejores rendimientos en TREO presentan un menor estado de metilación del promotor de BDNF, lo que se condice con la literatura al estar establecido experimentalmente que los mecanismos de metilación están asociados al silenciamiento génico y que BDNF es una proteína necesaria, tanto en su forma precursora como madura, para los procesos de plasticidad sináptica. El *Gráfico 8* ilustra la relación entre rendimiento y estado de metilación desglosado por individuos.

Gráfico 8.

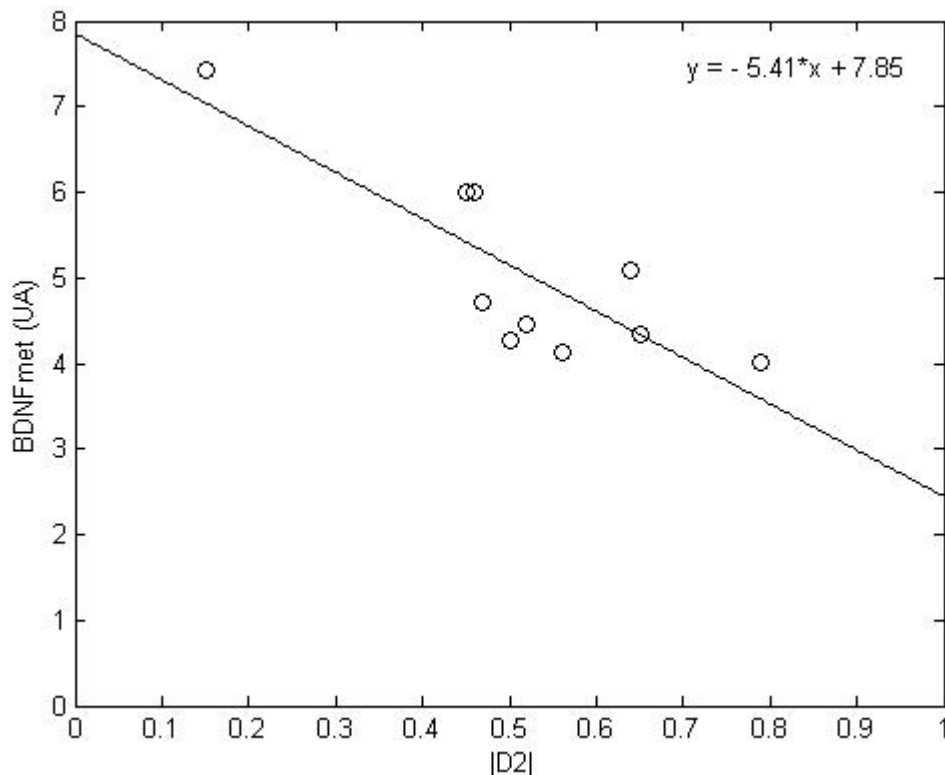


Gráfico del estado de metilación del promotor del gen de BDNF (eje y, normalizado con TUB-IV) y el rendimiento |D2| de cada una de las ratas (eje x), obteniéndose un coeficiente de correlación (Pearson) de -0.803 (n = 10). Puede apreciarse cómo el nivel de silenciamiento génico de la proteína BDNF con el rendimiento a nivel conductual, donde la correlación negativa nos muestra que a mayor estado de metilación, menor es el índice de reconocimiento de objetos.

Asimismo, al correlacionar el estado de metilación del gen de BDNF en CPr con el rendimiento D2 de la muestra en TREO, obtuvimos un coeficiente de Pearson igual a 0,031 (datos no mostrados). Este resultado muestra que existe una escasa relación entre D2 y activación de la transcripción del gen de BDNF, lo que nos sugiere que D2 no es un índice idóneo de discriminación, posiblemente al no tomar en cuenta la variabilidad individual expresada en la existencia de ratas “conservadoras” que exploran preferentemente el objeto A3, a pesar de haberlo reconocido como objeto familiar.

Al comparar los grupos G1, G2 y G3, mediante el Análisis de varianza (ANDEVA), obtuvimos, sorpresivamente, que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos ($p > 0.05$, *Gráfico 9*). Estos resultados hacen ostensible, por un lado, el problema metodológico acerca de si es posible crear un adecuado grupo de control en TREO, un paradigma de memoria al que subyace un proceso cognitivo extremadamente sensible que se desencadena ante la presentación de cualquier estímulo al campo visual de la rata, y por otro, la necesidad de determinar si la correlación observada en el *Gráfico 8* responde a una variabilidad en los niveles basales de secreción de BDNF (i.e. vía constitutiva) o si es TREO la que gatilla los cambios en los estados de metilación del gen de BDNF (vía regulada). En otras palabras, determinar si el estado de metilación es el antecedente del rendimiento [D2], o si el rendimiento [D2] es el antecedente del estado de metilación en la CPr de la muestra.

Gráfico 9.

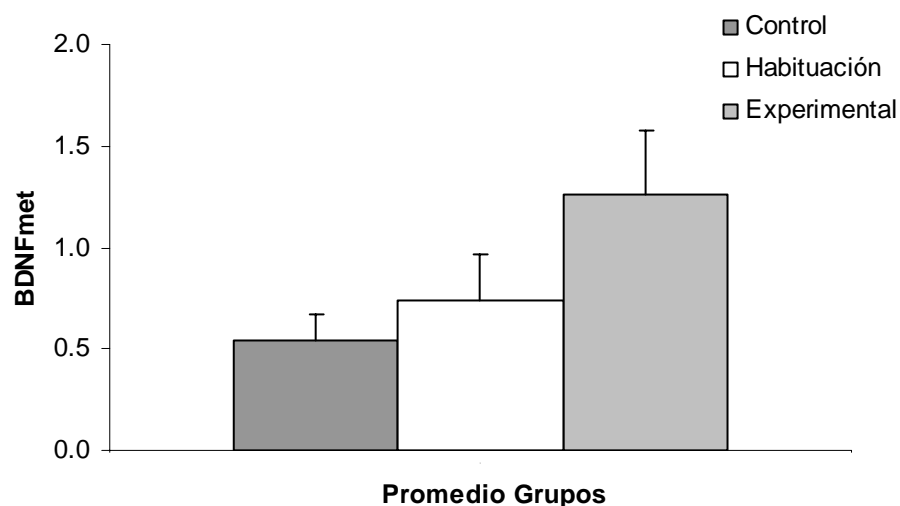


Gráfico del estado de metilación de los grupos control, habituación y experimental. ANDEVA muestra que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p > 0.05$, bigotes: S.E.M.).

3. Bioquímica

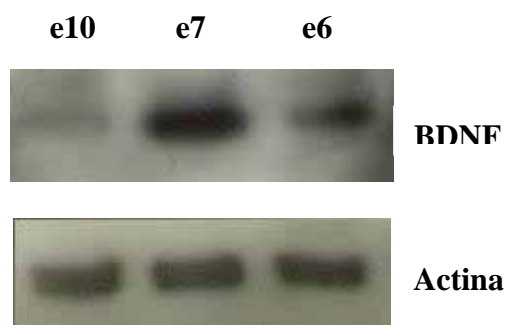
Las muestras obtenidas fueron normalizadas con anti actina 1:10000, tomando como anticuerpo secundario monoclonal anti mouse 1:10000, para así tener la seguridad que la cantidad de proteínas cargadas en los geles haya sido la misma para todos los animales. Las cuantificaciones de los resultados se muestran en las *Figuras 4 y 5*, y el desglose de éstos en la *Tabla 2*.

Figura 4.



Bandas de BDNF resultantes del inmunoblot. Muestras de grupo 1 y grupo 2.

Figura 5.



Bandas de BDNF representativas del grupo 3 resultantes de inmunoblot. Las bandas del panel inferior corresponden al control de carga realizado con actina.

Tabla 2.

| Grupo 3 (Experimental) | | |
|-------------------------------|-------------|--------------------------------|
| Rata | D2 | Inmunorreactividad BDNF |
| e1 | 0.70 | 1.59 |
| e2 | 0.52 | 0.79 |
| e3 | 0.50 | 0.39 |
| e4 | 0.64 | 0.99 |
| e5 | 0.65 | 0.97 |
| e6 | 0.53 | 0.79 |
| e7 | 0.79 | 1.47 |
| e8 | 0.73 | 1.03 |
| e9 | 0.46 | 0.38 |
| e10 | 0.15 | 0.23 |
| Prom | 0.57 | 0.86 |
| Std | 0.18 | 0.45 |
| SEM | 0.06 | 0.14 |
| | r = | 0.8550 |

Como se muestra en el *Gráfico 10*, se puede observar una correlación positiva entre la expresión de BDNF (maduro) en CPr, y el rendimiento en TREO ($r = 0.85$), lo que sugiere que un alto |D2| estaría asociado a una alta concentración proteica de BDNF en CPr. Esto es coherente con lo expuesto en el apartado anterior, donde se había encontrado una correlación negativa entre |D2| y el estado de metilación del exón I del gen de BDNF, ya que, según los modelos epigenéticos actuales, el silenciamiento génico que existe como resultado de la metilación del gen va acompañado con una disminución de la expresión de la proteína correspondiente.

Gráfico 10.

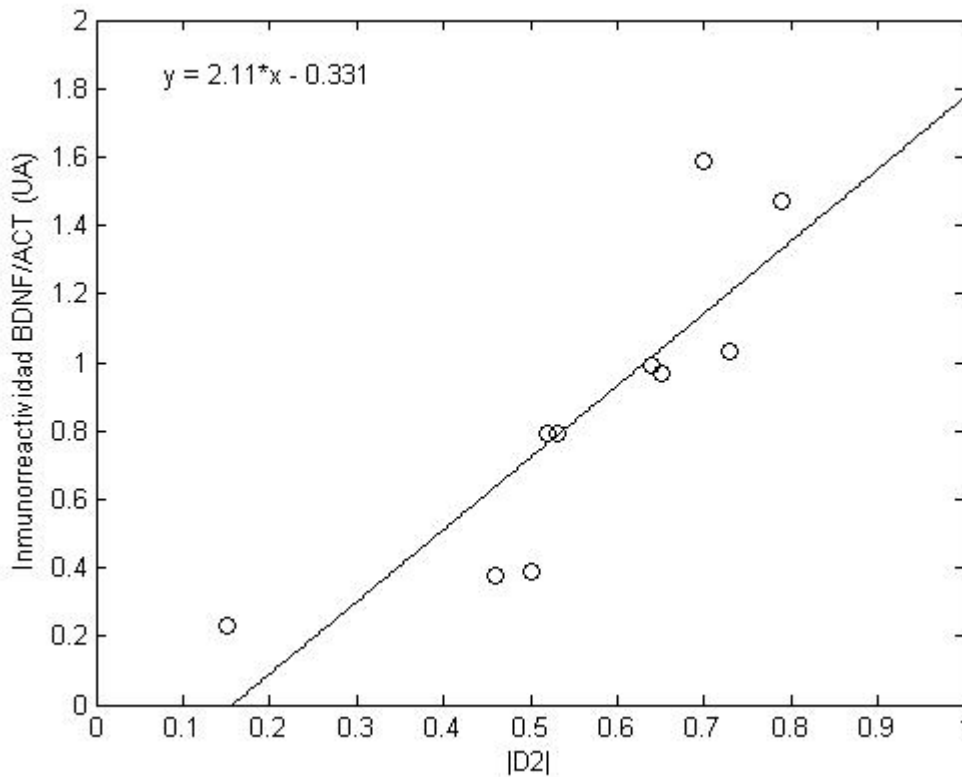


Gráfico de la concentración de BDNF en CPr (eje y, normalizado con anti actina) versus el desempeño en TREO (|D2|, eje x), con un coeficiente de correlación de 0.8550 (n = 10). Se aprecia una fuerte asociación entre la expresión de BDNF en la corteza peririnal de la tara y el rendimiento de esta a nivel conductual: altos niveles de proteína correlacionan con un exitoso reconocimiento de objetos.

Así también, y tal y como se mostró en los resultados biomoleculares, se encuentra una baja correlación entre el rendimiento D2 y la expresión de BDNF.

Por último, al comparar mediante ANDEVA los promedios de concentración de BDNF en CPr de los sujetos experimentales de G3 con G2 y G1, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$). Esto sugeriría que la concentración obtenida de BDNF en CPr no es desencadenada necesariamente por TREO ni por las características propias de esta tarea, si no que podría corresponder más bien a niveles basales de expresión que permiten entender ciertas diferencias individuales en el desempeño de los sujetos en TREO. Además, también pueden haber influido ciertas

características de los animales utilizados, ya que pudieron haber sido expuestos a diversas variables intervinientes que pudieron verse reflejado en los resultados esbozados en el *Gráfico 11*.

Gráfico 11.

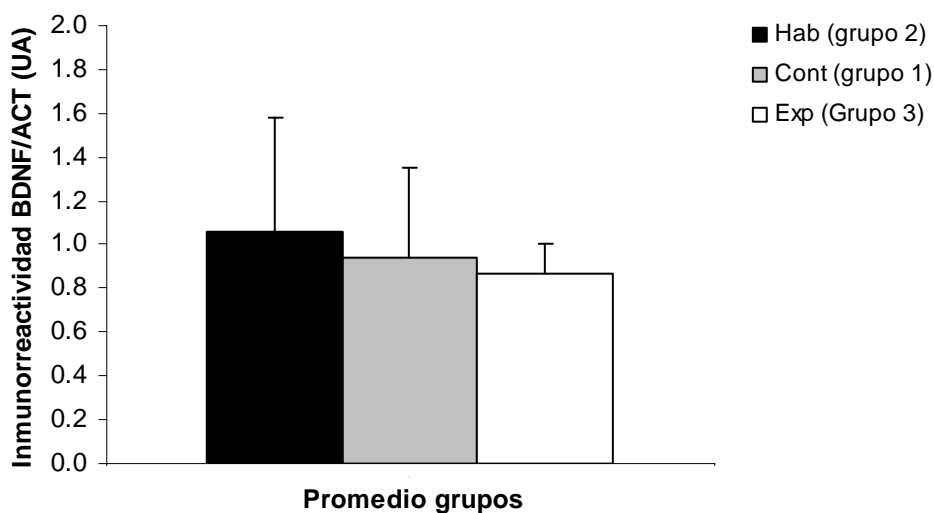


Gráfico de la concentración de BDNF en CPr en los distintos grupos del experimento 2. Se ve una escasa diferencia entre los grupos, no encontrándose un contraste significativo

Procedimos a determinar la relación entre el estado de metilación del gen de BDNF y la concentración de esta proteína en CPr en una muestra de 6 ratas de GE (*Gráfico 12*). Consistentemente con la literatura y los resultados expuesto en los apartados anteriores, encontramos un $r = -0.88$ entre ambas variables, lo que podemos interpretar como que un menor estado de metilación del gen de BDNF está asociado a una mayor concentración de BDNF en la muestra analizada.

Gráfico 12.

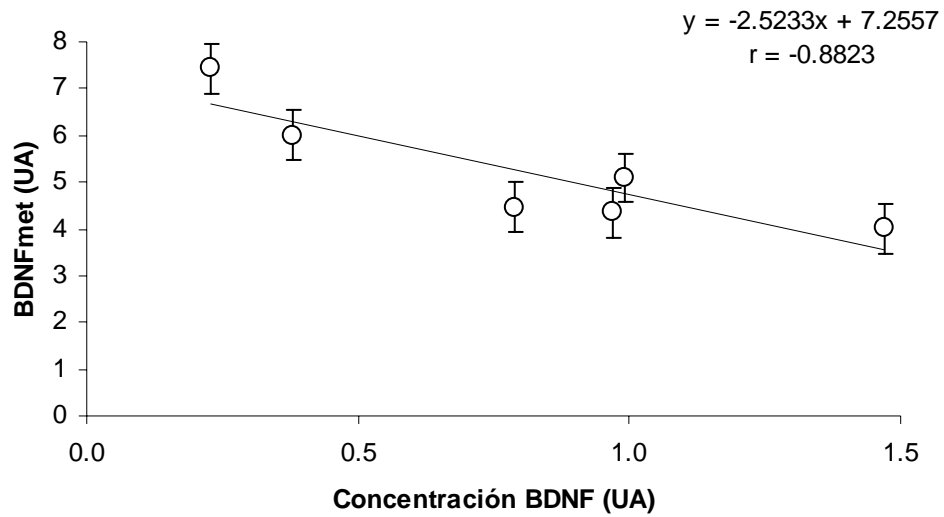


Gráfico del estado de metilación del gen de BDNF (eje y) y la concentración de BDNF (eje x) en CPr. Se observa que un mayor estado de metilación del gen de BDNF está estrechamente relacionado con una menor concentración de BDNF ($r = -0.88$, $n = 6$).

CONCLUSIONES

Los datos obtenidos en el presente trabajo sugieren que en TREO un tiempo de exploración estadísticamente significativo tanto por A3 como por B en FE debe considerarse como un indicador de reconocimiento de objetos. A nivel de conducta, tomar el indicador D2 hace que la muestra no logre superar los criterios de reconocimiento exitoso, sin importar el intervalo entre fases. El índice |D2|, por su parte, muestra índices significativos de reconocimiento, lo que se ve apoyado por la estrecha correlación obtenida entre rendimiento y desmetilación del promotor de BDNF, por un lado, y entre rendimiento y concentración de proteína en CPr, por otro, lo que sugiere que diferencias individuales en ratas *Sprague dawley* pueden explicar la preferencia por A3, sin que esto represente un fracaso en el reconocimiento.

Asimismo, los datos sugieren que el proceso de reconocimiento de objetos está asociado a cambios en el estado de metilación y de expresión de proteínas en CPr, en este caso particular de la neurotrofina BDNF. Este dato resulta relevante si tomamos en cuenta que TREO es un paradigma conductual que, al no utilizar reforzadores ni castigos, ofrece poco “incentivos” a su sustrato neurobiológico para que remodele su arquitectura neuronal, lo que se ve apoyado por la inexistencia de diferencias estadísticamente significativas entre las muestras G1, G2 y G3. De todos modos, al desglosar individualmente la muestra G3, los datos sugieren que el proceso cognitivo de reconocimiento de objetos involucra cambios cuantificables tanto en los patrones de metilación génica como en la expresión de proteínas implicadas en plasticidad.

DISCUSIÓN

Consideramos que estudios posteriores respecto a la actividad de las neurotrofinas en procesos plásticos a nivel de CPr deben efectuarse en tareas que impliquen un reforzador para el sujeto experimental, tales como DMS o DNMS. TREO muestra ser un paradigma de memoria demasiado “blando”, con mucha variabilidad individual y con un alto porcentaje de varianza atribuible a los criterios usados para considerar una conducta como dentro de la categoría de exploratoria. Por otra parte, existe una clara dificultad metodológica para establecer un verdadero grupo control en una tarea de memoria a la cual subyace un proceso cognitivo que se gatilla virtualmente ante cualquier perturbación del campo visual de un organismo.

El mecanismo de disminución de respuesta en CPr implicado en el reconocimiento de objetos sugiere que el papel preponderante a nivel neurobiológico estaría a cargo de la interacción proBDNF/p75^{NTR}, más que de mBDNF/TrkB (Brown y Xiang, 1998; Lu, 2005). Es necesario establecer diferencialmente si la concentración de la proteína madura o la precursora es la que muestra una mayor correlación con el rendimiento en TREO, así como determinar nivel de actividad de las proteasas encargadas del clivaje de proBDNF, y si éste está ocurriendo a nivel intra o extracelular. Esto puede apoyarse mediante estudios electrofisiológicos, utilizando los paradigmas de LTP y LTD, para correlacionarlos con los estados de metilación del gen de BDNF y expresión de BDNF en CPr. En su conjunto, esto permitiría esclarecer si las correlaciones obtenidas obedecen a patrones basales de metilación y expresión (vía constitutiva de secreción de BDNF), o si éstas son gatilladas por TREO por mecanismo de secreción dependientes de actividad (vía regulada).

Es importante también dilucidar el rol que tiene HC en TREO, ya que, al ser una tarea clásica dentro de la familiaridad en la memoria de reconocimiento, según Brown y Aggleton (2001), su

sustrato neuroanatómico preponderante sería la CPr. Como se sabe, cuando la tarea involucra más aspectos contextuales en memoria y aprendizaje trae consigo una mayor participación del HC (Squire et al, 2007), considerando elementos de recuerdo (*recollection*) dentro de la memoria de reconocimiento. Se podría pensar que un mayor número de sesiones de TREO podría relacionarse con actividad hipocampal, manifestándose, tal y como se ha visto en el presente estudio en CPr, en elementos constitutivos de la plasticidad sináptica, como el rol que juega BDNF en las sinapsis adultas, debido a que el roedor podría ya haber adquirido aspectos contextuales de la tarea.

REFERENCIAS

- Aicardi, G., Argilli, E., Cappello, S., Santi, S., Riccio, M., Thoenen, H., Canossa, M. (2004). Induction of long-term potentiation and depression is reflected by corresponding changes in secretion of endogenous brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Nov 2; 101(44):15788-92.
- Aid, T., Kazantseva, A., Piirsoo, M., Palm, K., Timmusk, T. (2007). Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *J Neurosci Res*. Feb 15; 85(3):525-35.
- Aggleton, J. P., Brown, M. W. (1999). Episodic memory, amnesia, and the hippocampal-anterior thalamic axis. *Behavioral and Brain Sciences*, 22 (3), 425-444.
- Aggleton, J. P., McMackin, D., Carpenter, K., Hornak, J., Kapur, N., Halpin, S., Wiles, C. M., Kamel, H., Brennan, P., Carton, S. & Gaffan, D. (2000). Differential cognitive effects of colloid cysts in the third ventricle that spare or compromise the fornix. *Brain*, 123 (1), 800-815.
- Baddeley, A.D. (1992). Working Memory. *Science* 255 (5044) 556-559.
- Baddeley, A.D., Hitch, G. J. (1994). Developments in the concept of working memory. *Neuropsychology* 8 (4) 485-493.
- Bartlett, J. M., Stirling, D. (2003). A Short History of the Polymerase Chain Reaction. *Methods Mol Biol*. 226:3-6.
- Bramham, C.R., Messaoudi, E. (2005). BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. *Prog Neurobiol*. Jun; 76(2):99-125.
- Broadbent, N. J., Squire, L. R., Clark, R. E. (2004). Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Nat Ac of Sciences USA*. 101 (40) 14515-14520.
- Brown, M.W., Aggleton, J.P. (2001). Recognition memory: what are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? *Nat. Rev. Neurosci*. Jan; 2(1):51-61.
- Brown, M.W., Bashir, Z.I. (2002). Evidence concerning how neurons of the perirhinal cortex may effect familiarity discrimination. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. Aug 29; 357(1424):1083-95.
- Burwell, R.D. (2001). Borders and cytoarchitecture of the perirhinal and postrhinal cortices in the rat. *J Comp Neurol*. Aug 13; 437(1):17-41.
- Bussey, T.J., Saksida, L.M., Murray, E.A. (2005). The perceptual-mnemonic/feature conjunction model of perirhinal cortex function. *Q J Exp Psychol B*. Jul-Oct; 58(3-4):269-82.

- Chen, W.G., Chang, Q., Lin, Y., Meissner, A., West, A.E., Griffith, E.C., Jaenisch, R., Greenberg, M.E. (2003). Derepression of BDNF transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MeCP2. *Science*. Oct 31;302(5646):885-9.
- Christman, J.K. (2002). 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene*. Aug 12; 21(35):5483-95.
- Clark, S.J., Statham, A., Stirzaker, C., Molloy, P.L., Frommer, M. (2006) DNA methylation: bisulphite modification and analysis. *Nat Protoc*. 1(5):2353-64.
- Cowell, R.A., Bussey, T.J., Saksida, L.M. (2006). Why does brain damage impair memory? A connectionist model of object recognition memory in perirhinal cortex. *J Neurosci*. Nov 22; 26(47):12186-97.
- Dix, S. L., Aggleton, J. P. (1999). Extending the spontaneous preference test of recognition: evidence of object-location and object-context recognition. *Behavioural Brain Research* 99 (2) 191-200.
- Ennaceur, A., Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. I. Behavioral data. *Behav Brain Res* 31: 47–59.
- Ennaceur, A., Neave, N., Aggleton, J. (1996). Neurotoxic lesions of the perirhinal cortex do not mimic the behavioural effects of fornix transection in the rat. *Behavioural Brain Search* 80 (1996) 9-25.
- Ennaceur, A., Neave, N., Aggleton, J. (1997). Spontaneous object recognition and object location memory in rats: the effects of lesions in the cingulate cortices, the medial prefrontal cortex, the cingulum bundle and the fornix . *Exp Brain Res*, 113:509-519.
- Ennaceur, A., Michalikova, S., Bradford, A., Ahmed, S., Bontempi, B. (2005). Detailed analysis of the Behavior of Lister and Wistar rats in anxiety, object recognition and object location tasks. *Behavioural Brain Research*, 159, (2):247-266.
- Faulkner, B., Brown, T.H. (1999). Morphology and physiology of neurons in the rat perirhinal-lateral amygdala area. *J Comp Neurol*. Sep 6;411(4):613-42.
- Gareth, R. I., Barker, G. R., Warburton, E. C. (2008) NMDA Receptor Plasticity in the Perirhinal and Prefrontal Cortices Is Crucial for the Acquisition of Long-Term Object-in-Place Associative Memory. *The Journal of Neuroscience* 28(11):2837-2844.
- Goldman-Rakic, P.S. (1992). Working Memory ant the mind. *Scientific American* 267 (3), 73-87.
- Gómez-Palacio Schjetnan, A., Escobar-Rodríguez, M. L. (2007). Codificación y retención de la memoria: el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en la plasticidad sináptica *Rev Neurol*; 45:409-417.

- Herman, J.G., Graff, J.R., Myöhänen, S., Nelkin, B.D., Baylin, S.B. (1996). Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 3; 93(18):9821-6.
- Hintzman, D. L., Caulton, D. A., Levitin, D. J. (1998). Retrieval dynamics in recognition and list discrimination: Further evidence of separate processes of familiarity and recall. *Memory and Cognition*, 26 (3), 449-462.
- Ji, Y., Pang, P.T., Feng, L., Lu, B. (2005). Cyclic AMP controls BDNF-induced TrkB phosphorylation and dendritic spine formation in mature hippocampal neurons. *Nat Neurosci*. Feb; 8(2):164-72.
- Kandel, E.R. (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science*. 2001 Nov 2; 294(5544):1030-8.
- Kelley, R., Wixted, J. T. (2001). On the nature of associative information in recognition memory. *Journal of Experimental Psychology: Learning, Memory, and Cognition*, 27 (3), 701-722.
- Klimesch, W., Doppelmayr, A., Yonelinas, A. O., Kroll, N. E. A., Lazzara, M., Rohm, D. & Gruber, W. (2001). Theta synchronization during episodic retrieval: Neural correlates of conscious awareness. *Cognitive Brain Research*, 12 (1), 33-38.
- Lavenex, P., Amaral, D.G. (2000) Hippocampal-neocortical interaction: a hierarchy of associativity. *Hippocampus*. 10(4):420-30.
- Levenson, J.M., Sweatt, J.D. (2005). Epigenetic mechanisms in memory formation. *Nat Rev Neurosci*. 2005 Feb; 6(2):108-18.
- Levenson, J.M., Roth, T.L., Lubin, F.D., Millar, C.A., Huang, I.C., Desai, P., Malone, L.M., Sweatt, J.D. (2006). Evidence that DNA (cytosine-5) methyltransferase regulates synaptic plasticity in the hippocampus. *J Biol Chem*. Jun 9; 281(23):15763-73.
- Lu, B., Pang, P.T., Woo, N. H. (2005). The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci*. Aug; 6(8):603-14.
- Martinowich, K., Hattori, D., Wu, H., Fouse, S., He, F., Hu, Y., Fan, G., Sun, Y.E. (2003). DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation. *Science*. Oct 31;302(5646):890-3.
- Miller, C.A., Sweatt, J.D. (2007). Covalent modification of DNA regulates memory formation. *Neuron*. Mar 15; 53(6):857-69.
- Okuda, S., Rozenaal, B., McGaugh, J.L. (2004) Glucocorticoid effects on object recognition memory require training-associated emotional arousal. *PNAS* 101 (3) 853-858.

- Platano, D., Bertoni-Freddari, C., Fattoretti, P., Giorgetti, B., Grossi, Y., Balianetti, M., Casoli, T., Di Stefano, G., Aicardi, G. (2006). Structural synaptic remodeling in the perirhinal cortex of adult and old rats following object-recognition visual training. *Rejuvenation Res.* Spring; 9(1):102-6.
- Reeves, A. & Sperling, G. (1986) Attention Gating in Short-Term Visual Memory. *Psychological Review* 93 (2), 180-206.
- Righi, M., Tongiorgi, E., Cattaneo, A. (2000). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) induces dendritic targeting of BDNF and tyrosine kinase B mRNAs in hippocampal neurons through a phosphatidylinositol-3 kinase-dependent pathway. *J Neurosci.* May 1; 20(9):3165-74.
- Schinder, A.F., Poo, M. (2000). The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* Dec; 23(12):639-45.
- Shi, C.J., Cassell, M.D. (1999). Perirhinal cortex projections to the amygdaloid complex and hippocampal formation in the rat. *J Comp Neurol.* Apr 12; 406(3):299-328.
- Shieh, P.B., Hu, S.C., Bobb, K., Timmusk, T., Ghosh, A. (1998). Identification of a signaling pathway involved in calcium regulation of BDNF expression. *Neuron.* Apr; 20(4):727-40.
- Sik, A., van Nieuwehuyzen, P., Prickaerts, J., Blokland, A. (2003). Performance of different Mouse strains in an object recognition task. *Behavioural Brain Research* 147 (2003) 49-54.
- Soulé, J., Messaoudi, E., Bramham, C.R. (2006). Brain-derived neurotrophic factor and control of synaptic consolidation in the adult brain. *Biochem Soc Trans.* Aug; 34(Pt 4):600-4.
- Squire, L. R. (1992). Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys and humans. *Psychological Review* 99 (2), 195-231.
- Squire, L. R., Zola-Morgan, S., Clark R. E. (2007). Recognition memory and the medial temporal lobe: a new perspective. *Nat Rev Neurosci.* Nov; 8(11):872-83.
- Squire, L.R., Zola-Morgan, S. (1991). The medial temporal lobe memory system. *Science* 253, 1380–1386.
- Steckler, T., Drinkenburg, W. H. I. M., Sahgal, A., Aggleton, J. P. (1998). Recognition Memory in rats — I. Concepts and classification. *Progress in Neurobiology* 54 (3) 289-311.
- Teng, K.K., Hempstead, B.L. (2004) Neurotrophins and their receptors: signaling trios in complex biological systems. *Cell Mol Life Sci.* Jan;61(1):35-48.
- Teng, H.K., Teng, K.K., Lee, R., Wright, S., Tevar, S., Almeida, R.D., Kermani, P., Torkin, R., Chen, Z.Y., Lee, F.S., Kraemer, R.T., Nykjaer, A., Hempstead, B.L. (2005). ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci.* Jun 1;25(22):5455-63.

- Timmusk, T., Palm, K., Metsis, M., Reintam, T., Paalme, V., Saarma, M., Persson, H. (2004). Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene. *Neuron*. Mar;10(3):475-89.
- Turner, B.M. (2002). Cellular memory and the histone code. *Cell*. Nov 1;111(3):285-91.
- Tulving, E., Schacter, D.L. (1990). Priming and human memory systems. *Science* 247, (4940) 301-396.
- Wan, H., Aggleton, J.P., Brown, M.W. (1999). Different Contributions of the Hippocampus and Perirhinal Cortex to Recognition Memory. *J. Neurosci*. Feb 1; 19(3):1142-8.
- Wan, H., Warburton, E. C., Zhu, X. O., Koder, T. J., Park, Y., Aggleton, J. P., Cho, K., Bashir, Z. I., Brown, M. W. (2004). Benzodiazepine impairment of perirhinal cortical plasticity and recognition memory. *European Journal of Neuroscience* 20 (8) 2214-2224.
- Warburton, E.C., Koder, T., Cho, K., Massey, P.V., Duguid, G., Barker, G. R. I., Aggleton, J.P., Bashir, Z.I., Brown, M.W. (2003). Cholinergic neurotransmission is essential for perirhinal cortical plasticity and recognition memory. *Neuron*. 38, (6). 987-996.
- Wade, P.A. (2004). Dynamic regulation of DNA methylation coupled transcriptional repression: BDNF regulation by MeCP2. *Bioessays*. Mar; 26(3):217-20.
- Whitlock, J.R., Heynen, A.J., Shuler, M.G., Bear, M.F. (2006). Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science*. Aug 25; 313(5790):1093-7.
- Woo, N.H., Teng, H.K., Siao, C.J., Chiaruttini, C., Pang, P.T., Milner, T.A., Hempstead, B.L., Lu, B. (2005). Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nat Neurosci*. Aug;8(8):1069-77.
- Yonelinas, A. P. (2002). The nature of recollection and familiarity: a review of 30 Years of Research. *Journal of memory and language*, 46 (3), 441-517.