



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN TEMPORAL DE LA
SINAPTOGÉNESIS HIPOCAMPAL INDUCIDA POR
POTENCIACIÓN A LARGO PLAZO EN RATAS
ADULTAS.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN PSICOLOGIA
P R E S E N T A:
LAURA ELISA RAMOS LANGUREN

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARTHA LILIA ESCOBAR
RODRÍGUEZ

ASESOR DE TESIS: MTRO. ALFONSO SALGADO BENITEZ

MEXICO, D.F.

2006



El estudio objeto de la presente fue posible gracias al apoyo del
PAPIIT proyecto IN213503.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

*“El tiempo pasa
el verano se va,
el otoño se aproxima
y perdemos algunas
de nuestras hojas,
algunas nacen en otro verano
y otras permanecen
por muchas estaciones.
Pero lo que nos deja más felices
es que las que cayeron
continúan cerca,
alimentando nuestra raíz
con alegría.”*

Jorge Luis Borges.

Agradecimientos.

En ocasiones no encontramos momentos adecuados para “dar las gracias” o creemos que las palabras no son suficientes para expresar el agradecimiento a toda esa gente tan importante a nuestro alrededor; sin embargo, cuando una etapa termina creo que es “una buena oportunidad” para hacerlo.

A Dios por todo lo que me ha dado.

A mis padres, Elisa Languren y José Ramos por todo su amor, su apoyo, su preocupación, por siempre darme esos empujones para seguir adelante y sobre todo por ser un gran ejemplo de vida, los amo, gracias.

A “mis hermanitos”, por todos esos momentos tanto de alegrías como de corajes y tristezas, gracias Mar y Rubs, los quiero mucho.

A la máxima casa de estudios: la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme la oportunidad de seguir creciendo académica y personalmente.

A mi directora de tesis Martha Lilia Escobar Rodríguez, por impulsarme y apoyarme en mi ahondar en el interesante mundo de las Neurociencias, gracias Martha.

A mis sinodales: Alfonso Salgado Benítez, César Casasola Castro, Gabriela Orozco y Hugo Sánchez, por sus sugerencias y aportaciones para mejorar esta tesis.

A mis familiares y muy en especial a mis primos Javier, Berna, Lili y por supuesto mi también próxima colega Nadya (mejor conocida como Niwish), a mi “tía Gela” y a mis “abuelitos”: Leonila y Francisco, por todo su apoyo y por confiar en mí.

A los profesores que en mi educación fueron un parte aguas: Antonio Rojas Reza, Benjamín Ayluardo López, Roberto Romero (mi Robert teacher), Dolores Rodríguez, Jose María Calvo y Otálora, Elisa Saad, Irma Castañeda y Nicole Trocherie.

A Daisy, por permitirme mostrarle mi lado oculto, por ser una gran amiga, por todo su apoyo incondicional, porque a pesar de que el tiempo y la distancia nos separaron (un poquito) nunca has dejado de estar a mi lado.

Al H. Consejo de LP & S y por esas interesantes y divertidas reuniones de miércoles ¿las recuerdan? a Naye, Iris, Gabyruchis y en especial a Viri, por todo lo que aprendí de ti, por ser una gran persona que me ha brindado su confianza y por sacarme un rato a conocer el mundo. Gracias a todas por brindarme su amistad y ser tan especiales para mi.

A mis compañeros y amigos del laboratorio: a Olga y Andreita por enseñarme tanto, por su paciencia, por su apoyo y amistad, a Dianita por su cariño y por ser mi confidente, a Luisito por esos “malos viajes” y todo su apoyo. A todos muchas gracias, en especial por esos momentos después de cada seminario, por las porras (eeh!) y por compartir conmigo esa inquietud por las Neurociencias.

A mis colegas y amigos: a mi “gollum querido” Abel, a mi Rogercito, Fer, Estrellita, Isra, “Lalito”, a mi “querida teatrera” Marisol, a Claus, Ale Ruiz, Zeidy, Livia Albertito, Hugo, Sami, Blanca, Perlita y Jesús por dejar una enorme huella en mi vida.

A "Mon petit ange" por su apoyo, compañía, comprensión, tiempo, por sus consejos y por su amor, especialmente, "pour me laisser te connaître et me permettre être ta petite sorcière et quelques fois ta psychologue".

A mis grupos de niños de Kts., especialmente, a mi primera generación, por ser unas "pequeñas grandes almas" que me han enseñado tanto y me han contagiado su alegría.

A "my new family": Rosita, Joel, Ale y a los pequeños Joe y Alex, por darme su cariño.

A Gisela Sierra por el apoyo académico y personal brindado en mi carrera.

A mis terapeutas del Instituto Nacional de Rehabilitación y del Hospital Obregón, por ayudarme a salir adelante, por esas preguntas acerca de mi tesis y por convertirse en mis amigos: Iliana, Paco, Vicente, Paz y Maggie.

A Rubén, "el buen Benjas", Pachito y el Padre Fili por ser mis confidentes, por guiarme y ser mis amigos, sobre todo por contribuir a que pueda realizar mis proyectos personales.

A "mes amis" por esos cafecitos y lo que sale en ellos, a "ma chérie madame fayote" Maru, a "une petite sorcière comme moi" Era, a "la petite fille du matin" Sylvie, a "monsieur beau" Juan Carlos, a Monique y Amanda.

A Emily, porque nunca me abandonas, en especial en los momentos difíciles.

A mis pequeñas estrellitas: Sully y Hanna, por ser unas almitas nobles que me han iluminado.

A todas las personas que han formado parte de las hojas que continúan alimentando mi raíz y mis memorias.

CARACTERIZACIÓN TEMPORAL DE LA SINAPTOGÉNESIS
HIPOCAMPAL INDUCIDA POR POTENCIACIÓN A LARGO
PLAZO EN RATAS ADULTAS.

Los mecanismos que subyacen a los procesos de aprendizaje y memoria en el sistema nervioso no han sido del todo esclarecidos, sin embargo, hoy en día sabemos que tales procesos pueden tener sus bases en modificaciones entre las conexiones neuronales. Para poder abordar el estudio de los mecanismos celulares que subyacen al almacenamiento de información se ha empleado el modelo celular denominado Potenciación a Largo Plazo (LTP, por sus siglas en inglés), ampliamente relacionado con procesos plásticos como el aprendizaje y la memoria. La LTP, descrita por Bliss y Lomo en 1973, se traduce en un incremento prolongado de la eficiencia sináptica, debido a la estimulación repetitiva de las vías aferentes a un área determinada del sistema nervioso central (SNC). En investigaciones recientes se ha demostrado que la inducción de LTP genera cambios morfológicos en las neuronas, principalmente formando nuevos contactos entre ellas. Las fibras musgosas, son un subsistema celular dentro del hipocampo, el cual tiene una participación importante en algunos procesos de aprendizaje y memoria, constituyendo un escaparate para el estudio de los fenómenos plásticos, debido a su alta susceptibilidad para inducir LTP y para experimentar modificaciones de tipo anatómico, es decir, reorganización sináptica. Estudios en torno a la LTP inducida en la vía que va del giro dentado al área CA3 hipocampal (fibras musgosas), muestran que se genera una reorganización sináptica susceptible de ser analizada mediante la técnica histoquímica de TIMM, la cual, permite observar variaciones en las concentraciones de zinc de los botones sinápticos de las fibras musgosas. No obstante, el curso temporal de esta reorganización sináptica no ha sido caracterizado, por lo cual en este estudio se analizaron distintas ventanas de tiempo entre la inducción de LTP y el procesamiento de análisis histoquímico, con el fin de de caracterizar la progresión de los cambios estructurales generados por la actividad. Los resultados derivados de la presente investigación muestran que tras 3 días post-estimulación capaz de inducir LTP en el sistema de comunicación de las fibras musgosas no se presenta aún la reorganización sináptica de éstas. La reorganización sináptica se observa hacia los 7 días post-estimulación conformando una banda de contactos sinápticos en la zona infrapiramidal del estrato oriens del área CA3 hipocampal, en ausencia de actividad epiléptica. Dicha reorganización es bilateral con carácter prominentemente contralateral. Sin embargo, la reorganización inicialmente observada hacia los 7 días post-estimulación experimenta modificaciones a través del tiempo presentando hacia el día 15 una apariencia bilateral que permanece al menos 75 días más. Los resultados derivados del presente estudio apoyan la concepción de que los cambios morfológicos dependientes de la experiencia constituyen un mecanismo fundamental para el almacenamiento de la memoria a largo plazo.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	2
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 La formación hipocampal	3
<i>2.1.1. Características anatómicas y fisiológicas generales</i>	3
<i>2.1.2. Las fibras musgosas</i>	6
<i>2.1.3. El hipocampo: estructura relacionada con la plasticidad y los procesos de aprendizaje</i>	10
2.2. Plasticidad sináptica estructural	16
<i>2.2.1. Sinaptogénesis en mamíferos adultos dependiente de la actividad</i>	18
2.3 Potenciación a largo plazo	24
<i>2.3.1. Características generales</i>	24
<i>2.3.2. Mecanismos moleculares de la LTP</i>	28
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	34
4. OBJETIVOS	34
5. METODOLOGÍA	35
5.1. Sujetos experimentales	35
5.2. Electrofisiología	35
5.3. Técnica histoquímica de Timm	36
5.4. Diseño experimental	38
6. RESULTADOS	39
6.1. Resultados electrofisiológicos	39
6.2. Resultados histoquímicos	49
7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	53
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

1. INTRODUCCIÓN

El tratar de dilucidar los mecanismos mediante los cuales el sistema nervioso almacena información por periodos prolongados, ha sido una cuestión de estudio para la neurociencia en las últimas décadas. Diferentes investigadores han formulado explicaciones sobre cómo ocurre el almacenamiento de información. En 1894 Santiago Ramón y Cajal, planteó que el aprendizaje involucra cambios plásticos funcionales en las propiedades de las neuronas o en sus interconexiones. Así, el aprendizaje podría ser el resultado de una modificación morfológica entre las conexiones neuronales, similar a los fenómenos que ocurren durante la formación de sinapsis en la vida embrionaria (citado por Bailey et al., 2000). En 1949 Donald Hebb postuló que aun cuando los circuitos interneuronales se establecen genéticamente, la fuerza o la eficiencia de ciertas conexiones no está determinada totalmente, de lo cual infirió que dichos cambios son capaces de modificar sus propiedades como resultado de cambios en su actividad (Pinel, 2001).

Actualmente sabemos que el cerebro se modifica como consecuencia de la actividad a la que se somete, esto se ha vuelto fundamental para tratar de explicar cómo los individuos almacenan la información proporcionada de la interacción con su medio ambiente. Es esto lo que nos permite adaptarnos y comportarnos de forma adecuada en el entorno que nos rodea. Las modificaciones estructurales del sistema nervioso central (SNC) y los mecanismos que subyacen al incremento de la eficiencia sináptica tienen especial relevancia para el estudio de los fenómenos de aprendizaje y memoria, fundamentalmente debido a que representan expresiones de la plasticidad sináptica de largo plazo. Sin embargo, la caracterización de los cambios morfológicos que subyacen a los procesos de aprendizaje y memoria es aun incipiente por lo cual la presente investigación tiene como objeto fundamental el poder caracterizar el inicio y permanencia de las modificaciones morfológicas involucradas con los procesos cognitivos ya mencionados.

2. MARCO TEÓRICO

Hoy en día se sabe que existen regiones del cerebro involucradas en el aprendizaje y la memoria, entre ellas se encuentran el cerebelo, los lóbulos temporales, la neocorteza y la formación hipocampal (Bear y Connors, 2001). Asimismo se sabe que la memoria y el aprendizaje resultan de la modificación en la comunicación sináptica como una expresión de los procesos plásticos que experimenta el sistema nervioso (Bear, 1996). Varios investigadores como Ramón y Cajal (1911), Hebb (1949), Eccles (1965), entre otros, han sugerido que el almacenamiento de información puede traer como consecuencia modificaciones en las conexiones sinápticas (Hosokawa et al., 1995; Milner et al., 1998; Bailey et al., 2004). Actualmente numerosas evidencias experimentales señalan que dichos eventos plásticos pueden incluir cambios en la estructura, distribución y número de sinapsis, y se ha sugerido que en estos cambios morfológicos subyace la formación de la memoria, tal como lo planteaba Ramón y Cajal (Ramírez- Amaya et al, 1999; Genismann, 2000; Carmichael, 2003; Lamprecht y Le Doux, 2004, Segal, 2005).

2.1 La formación hipocampal.

2.1.1. *Características anatómicas y fisiológicas generales.*

La formación hipocampal es una estructura cortical filogenéticamente antigua localizada en los hemisferios cerebrales, bajo la neocorteza. Anatómicamente se ha dividido en dos regiones principales: el giro dentado y los campos de Ammón, o hipocampo propiamente dicho, que a su vez se subdivide en cuatro áreas CA1-CA4 (CA: *Cornus ammonis*), (Amaral y Witter, 1995). La formación hipocampal incluye también distintas estructuras vecinas como el subículum y la corteza entorrinal (Fernández-Espejo, 1996).

Tanto el hipocampo como el giro dentado constituyen un tejido neural que consta de tres estratos laminares, a lo que se le denomina archicorteza. Estas láminas son la polimórfica (estrato oriens), piramidal (estrato piramidal) y molecular (estrato radiado y estrato lagunoso-molecular) (Fernández-

Espejo, 1996). En la formación hipocámpal se encuentran tres tipos principales de neuronas: piramidales (estrato piramidal), células granulares (giro dentado) y las neuronas intrínsecas (neuronas en cesta o interneuronas inhibitorias) (Fernández-Espejo, 1996) (Fig. 1).

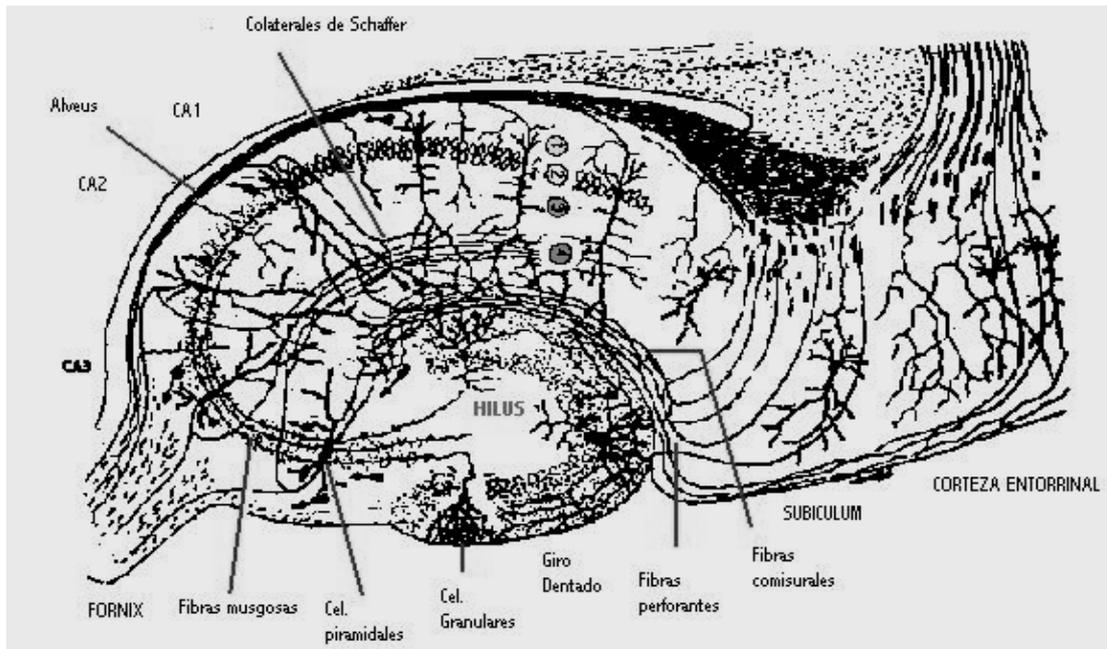


Figura 1. Corte de tejido de hipocampo donde se muestran los elementos neuronales, haces y regiones de la formación hipocámpal. (Cajal, 1911; tomado de Fernández-Espejo, 1996). 1. Estrato oriens, 2. Estrato piramidal, 3. Estrato radiado, 4. Estrato lagunoso-molecular.

El hipocampo es una estructura con un circuito básico llamado *trisináptico*; en el cual la *primera sinapsis* se da cuando el haz perforante que procede de la corteza entorrinal se dirige hacia las células granulares. Luego, el axón de las células granulares (fibras musgosas) establece una *segunda sinapsis* con las dendritas apicales de las neuronas piramidales en CA3; por último los axones de las neuronas piramidales de CA3 envían sus proyecciones llamadas colaterales de Schaffer hacia el área CA1, de manera que se forma la *tercera sinapsis*. Algunos de los axones de estas neuronas piramidales de CA3 regresan al estrato radiado y hacen sinapsis con las propias neuronas de CA3 por lo que se han denominado colaterales recurrentes (Andersen et al., 1966 en Fernández-Espejo, 1996) (Fig. 2).

Desde el punto de vista electrofisiológico, el hipocampo produce un ritmo caracterizado por un patrón irregular, lento de 4 a 8 Hz, denominado ritmo theta (Bear, 1996). Se piensa que en el hipocampo hay 1,000,000 de células granulares, 160,000 células piramidales en el área CA3 y 250,000 células piramidales en el área CA1; además cada neurona del área CA3 recibe 80 botones sinápticos de fibras musgosas, 4,500 de fibras comisurales y 7,700 de colaterales (Fernández-Espejo, 1996).

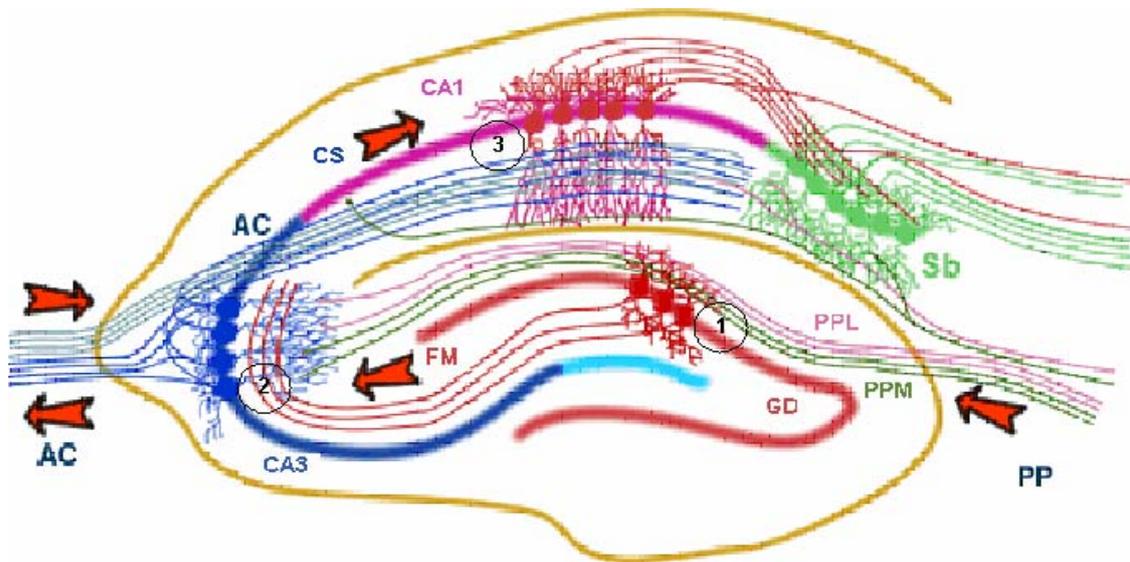


Figura 2. Diagrama del circuito trisináptico de la formación hipocámpica 1. Primera sinapsis, (Patrón perforante-Células granulares), 2. Segunda sinapsis (Fibras musgosas-Dendritas piramidales del CA3), 3. Tercera sinapsis Colaterales de Schaffer-Dendritas piramidales del CA1). Abreviaturas: AC, axones comisurales; CA, *Cornus ammonis*; CS, Colaterales de Schaffer; GD, Giro dentado; FM, Fibras musgosas; PP, Patrón perforante; PPL, Patrón perforante lateral; PPM, Patrón perforante medial.

El hipocampo recibe aferencias principalmente provenientes de la corteza entorrinal, el septum y el hipocampo contralateral. Se le denomina patrón perforante al haz de fibras que provienen de la corteza entorrinal y hacen contacto con las células granulares del giro dentado y con el haz comisural. Las aferencias procedentes del septum llegan por el fórnix, la estría supercallosa y la estría terminal; los axones hipocámpicos contralaterales entran por el psalterium y la fimbria, ésta última recibe

también aferencias del tálamo, hipotálamo y la amígdala, así como aferencias dopaminérgicas del tronco del encéfalo (áreas A8 y A10), aferencias serotoninérgicas de los núcleos de rafe y noradrenérgicas del locus coeruleus (Fernández-Espejo, 1996).

Los neurotransmisores más importantes en la formación hipocampal son el glutamato (el neurotransmisor excitatorio por excelencia, encontrado principalmente de el área CA3, en las terminaciones del giro dentado, la corteza entorrinal y las interconexiones entre CA3 y CA1) y el GABA (*ácido gamma-aminobutírico*, el principal neurotransmisor inhibitorio localizado en las sinapsis de las interneuronas), asimismo en el hipocampo se encuentran otros neurotransmisores como la acetilcolina, noradrenalina, dopamina y serotonina, (Fernández-Espejo, 1996).

La participación diferencial de subsistemas celulares dentro del hipocampo en los procesos biológicos de aprendizaje y memoria, ha sido una vía para adentrarse en la elucidación de los mecanismos a nivel celular de dichos procesos. Uno de los subsistemas del hipocampo que ha sido ampliamente estudiado es el de las fibras musgosas, puesto que es bastante accesible al estudio histológico, electrofisiológico y bioquímico, debido principalmente, al gran tamaño relativo de sus componentes y a su estructura laminar (Amaral y Dent, 1981).

2.1.2. *Las fibras musgosas.*

Características anatómicas.

En el giro dentado se localizan las células granulares de 10 μm de diámetro, tienen de 1 a 4 dendritas muy espinosas que se arborizan a su alrededor, los axones de estas células son denominados *fibras musgosas* y hacen sinapsis con las dendritas apicales piramidales, principalmente en el área CA3 (Fernández-Espejo, 1996). Las sinapsis entre las fibras musgosas y las neuronas piramidales, las cuales son de gran importancia para el presente estudio, son excitatorias, y su estructura y situación (muy cercano al soma neuronal) sugieren un papel muy destacado (Fernández-Espejo, 1996).

Los axones de las fibras musgosas fueron descritos inicialmente por Golgi y Sala y eventualmente nombradas por Cajal por las similitudes anatómicas de las fibras encontradas en el cerebelo que Cajal había denominado previamente como fibras musgosas (Henze et al., 2000).

Las células granulares reciben aferencias masivas desde la corteza entorrinal, la cual llega a los dos tercios externos de sus dendritas; en su tercio interno reciben una proyección del *hilus ipsi* y contralateral. De su polo somático basal emerge un axón que luego tiene varias ramificaciones (se han observado mas de seis) en el *hilus*. Estos axones se reúnen en el *hilus* y forman la proyección compacta hacia la región CA3 (fibras musgosas) (Gaarskjaer, 1986). La proyección de las fibras musgosas se restringe a la región CA3 en las ratas y ratones. Se le ha dividido en dos secciones: la principal, denominada suprapiramidal, hace sinapsis en passant en la zona proximal de las dendritas apicales de las células piramidales en CA3; la sección secundaria denominada infrapiramidal, hace sinapsis del mismo tipo de la anterior pero en las partes proximales de las dendritas basales de las células piramidales del área CA3. Esta segunda sección se extiende normalmente solo desde el hilus hasta el primer cuarto de la distancia entre éste y la terminación del área CA3 en las ratas de la cepa Wistar (Schwegler et al., 1993). Las terminales axónicas de las fibras musgosas están conformadas por botones sinápticos gigantes (4 a 10 μm en el eje más grande), con múltiples dobleses y varicosidades; estos botones se encuentran invaginados por excrecencias y espinas gigantes de las células piramidales, a los que típicamente envuelven completamente formando grandes complejos sinápticos (figura 3) (Amaral y Dent, 1981; Nicoll y Schmitz, 2005). Por esto, cada botón sináptico hace múltiples sinapsis asimétricas con las espinas dendríticas. Este tipo de morfología ultraestructural es característica de las terminales de las fibras musgosas y se ha encontrado que se conserva en muchas especies de mamíferos. La morfología de las postsinapsis y de los botones terminales, aunado al hecho de que cada fibra recibe muchas sinapsis en passant, es lo que le da

apariencia de musgosa a estas fibras y de ahí se deriva su nombre (Henze et al., 2000).



Figura 3. Micrografía electrónica del complejo sináptico de las fibras musgosas. La dendrita de la célula piramidal postsináptica del área CA3 (DEN), es envuelta por la terminal presináptica de una fibra musgosa (MF). La terminal presináptica contiene una cantidad numerosa de vesículas y algunas mitocondrias. La excrescencia de la terminal postsináptica (S) es penetrada por el botón de la fibra musgosa. Las uniones simétricas y asimétricas en este complejo son indicadas por las cabezas de flecha y las flechas respectivamente (Amaral y Dent, 1981)

Características bioquímicas.

Las fibras musgosas son una proyección excitatoria, que utiliza principalmente glutamato en la neurotransmisión pero también emplea péptidos opioides. Algunas de las particularidades de la actividad electrofisiológica de las fibras musgosas parecen recaer sobre estos péptidos, los cuales principalmente son las dinorfinas y las encefalinas (Morris y Johnston, 1995). La modulación de los péptidos opioides en las fibras musgosas da lugar a fenómenos como la potenciación a largo plazo

(LTP, por sus siglas en inglés) y a la reorganización sináptica de estas fibras (Escobar et al., 1997).

Tanto las dinorfinas como las encefalinas se derivan cada una de un gen distinto, cuyo producto es luego dividido para dar lugar a los péptidos activos en la neurotransmisión. Todas las células granulares expresan constitutivamente el gen prodinorfina. Además, un 15% de ellas expresan el gen proencefalina (Morris y Johnston, 1995).

El efecto de los péptidos sobre las células piramidales del área CA3 depende del tipo de receptor sobre el cual actúen. Hasta la fecha se han descrito 3 tipos de receptores opioides: los tipos κ_1 , de efecto inhibitorio, en general sensibles a los péptidos derivados del gen prodinorfina y los tipos μ y δ , de efecto excitatorio, en general sensibles a los péptidos derivados del gen proencefalina. Estos tres tipos de receptores se han encontrado en las células piramidales de CA3, por lo que se concluye que los péptidos opioides tienen importantes funciones en la modulación de la transmisión sináptica en esta conexión (Morris y Johnston, 1995, Escobar et al., 1997).

Los péptidos derivados del gen proencefalina son liberados únicamente cuando las fibras musgosas son estimuladas a alta frecuencia, mientras que los derivados del gen prodinorfina son liberados por la estimulación basal de baja frecuencia (Morris et al., 1988), este hecho, junto con el cambio en la cantidad de proteínas expresadas derivadas de estos genes, que ha sido observado en las células granulares, al ser estimuladas, los hace candidatos en la modulación de las fibras musgosas.

Eléctricamente esta proyección responde a la estimulación directa como otras en el SNC. Sin embargo, posee características especiales en su comportamiento ante algunos tipos de estimulación eléctrica como la Potenciación a Largo Plazo (fenómeno que se define como el incremento prolongado de la eficiencia sináptica debido a la estimulación repetitiva de las fibras aferentes a un área determinada del SNC). Al estudiar la inducción de la LTP en las fibras musgosas se han encontrado dos puntos fundamentales en que el proceso de inducción difiere con respecto al de otras sinapsis donde se ha logrado inducir LTP, como la vía del patrón perforante o las

colaterales de Schaffer (Urban et al., 2001), por un lado no parece depender de la activación de la célula postsináptica para su inducción. Por otro lado no depende de la activación de los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) (Nicoll y Malenka, 1995). Al parecer el elemento crucial en la inducción de la LTP en estas fibras es la activación de receptores para péptidos opioides (Derrick et al., 1991), concretamente el receptor de tipo μ (Derrick et al., 1992). Incluso se ha demostrado que la activación del receptor de tipo κ impide la inducción de LTP (Teran et al., 1994).

2.1.3. El hipocampo: estructura relacionada con la plasticidad y los procesos de aprendizaje.

El aprendizaje ha sido descrito como el proceso mediante el cual un organismo adquiere la nueva información del medio que lo rodea, mientras que la memoria se define como la forma en la cual se almacena dicha información. La memoria se ha categorizado como explícita o declarativa e implícita o no declarativa, la primera implica la información acerca de hechos, lugares y eventos, mientras que la segunda se refiere a la información que comprende hábitos, habilidades motoras, así como formas asociativas de memoria como el condicionamiento clásico y formas no asociativas como la habituación (Eichenbaum 2004). Las estructuras del sistema nervioso central implicadas en la memoria explícita son el lóbulo temporal y estructuras diencefálicas como el hipocampo el subiculum y la corteza entorrinal; por otra parte la memoria implícita comprende estructuras como el cerebelo y los ganglios basales (Bear, 2001; Lynch 2004).

Generalmente, las memorias declarativas están disponibles a la recolección consciente, mientras que las memorias de procedimiento no (Bear, 2001, Lynch, 2004). Las memorias explícitas o declarativas son fácilmente formadas y fácilmente olvidadas, mientras que formar memorias no declarativas suele implicar más repetición y práctica durante un lapso de tiempo, y es por eso que son difícilmente olvidadas.

El hipocampo, juega un papel importante en las funciones de memoria y aprendizaje de tipo declarativo, como lo han reportado las observaciones

de los efectos adversos que provoca tanto en seres humanos como en monos y ratas la lesión o alteración de esta estructura (Squire, 1992). Asimismo se ha relacionado al hipocampo con tareas de tipo espacial (O'keefe y Dostrrovsky, 1971; Volpe et al., 1992; Ramírez- Amaya et al, 1999).

Las investigaciones que se han podido realizar en humanos, han sido fundamentalmente estudios de varios casos, en los cuales existen disfunciones de la memoria. Un ejemplo de estos casos es el descrito por la Dr. Brenda Milner, quien en 1959, estudió a un joven al que llamó H.M. A este paciente se le había extirpado parte de los lóbulos temporales y el hipocampo, debido a que en dichas áreas presentaba un foco epiléptico (Fig. 4). Posterior a la cirugía su coeficiente intelectual (CI) no disminuyó después de la operación y podía recordar sucesos que precedieron a ella, sin embargo, nada de lo que sucedía desde la operación, persistía en su memoria por más de cinco minutos. H.M., era capaz de recordar sucesos que habían sucedidos años antes. Era capaz de reconocerse en fotografías de su niñez, y sin embargo, no podía identificarse cuando se veía en el espejo posterior a la operación; también podía reconocer lugares anteriores a su cirugía como su casa en la que habitó en la niñez, pero posteriormente no podía localizar su nueva dirección. La Dra. Milner trabajó con él por más de 40 años y de manera increíble, tenía que presentarse en cada ocasión que se veían (Milner et al.,1998), todo ello como parte de las manifestaciones de la severa amnesia anterógrada que caracteriza al paciente H.M.

Este paciente presentaba fallas importantes en tareas que implicaran una respuesta posterior a un determinado periodo de tiempo y por esto se creía que sería imposible que pudiera adquirir algún tipo de aprendizaje después de la lesión. Sin embargo, en 1962, la Dra. Milner demostró que H.M. era capaz de aprender una tarea de dibujo a través del espejo, obteniendo una retención estable después de varios días. La tarea consistía en que el dibujo de una estrella de doble margen tenía que ser delineada a través de un espejo, sin tocar alguno de los márgenes. Después de 3 días y 30 ensayos, H.M. fue capaz de disminuir sus errores significativamente

(Milner et al.,1998) a pesar de no tener ningún recuerdo de haber realizado la prueba con anterioridad (Fig. 5.). Este contribuyó en gran medida a la idea que existe más de un sistema de memoria en nuestro cerebro.

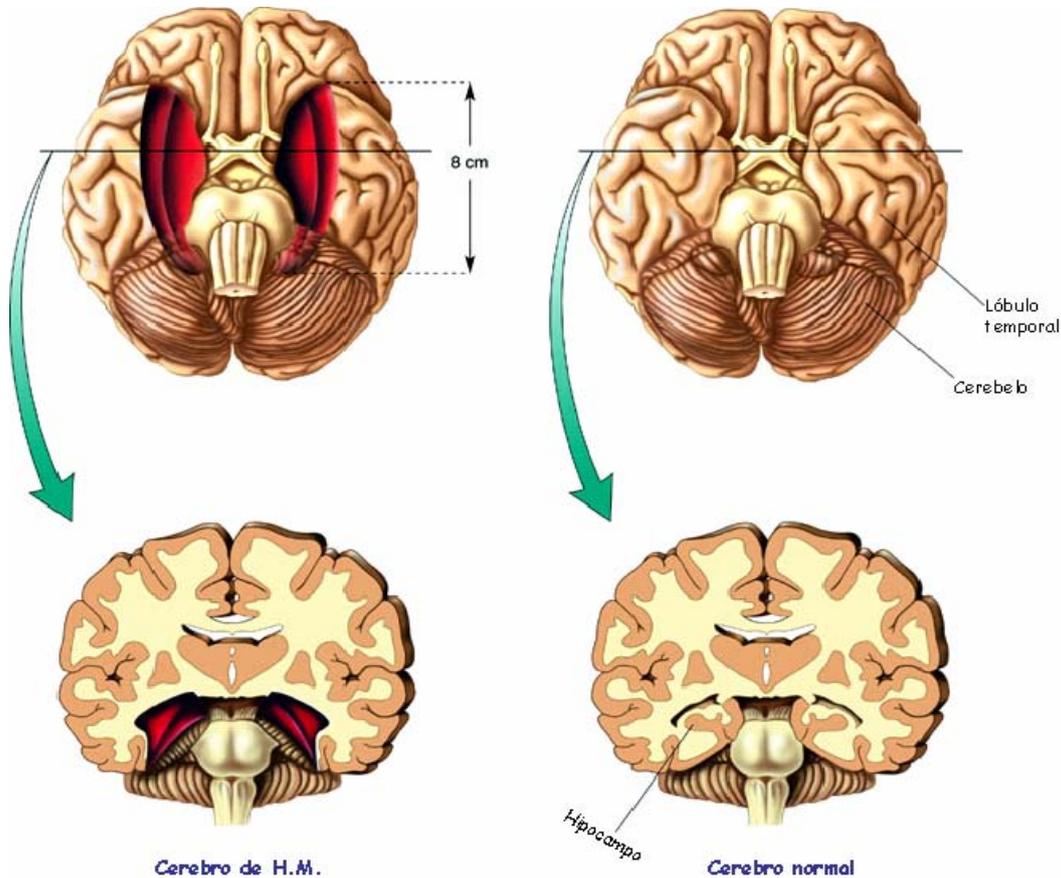


Figura 4. Área de la lesión posterior a la extirpación de los lóbulos temporales en H.M. Izquierda: Cerebro del paciente H.M., Derecha: Cerebro de un paciente normal, (Modificado de Bear, 2001).

A través de este caso se estudiaron muchos otros pacientes con el propósito de elucidar el papel que tienen las formaciones temporales en los procesos de recuerdo. Pero poco a poco fue surgiendo la inquietud de buscar un modelo animal que pudiese replicar los hallazgos en humanos, con el fin de buscar explicaciones a los mecanismos biológicos de la memoria. Los modelos animales más empleados para tal fin han sido ratas, ratones y monos de diferentes especies (Squire y Zola-Morgan, 1991; Squire, 1992).

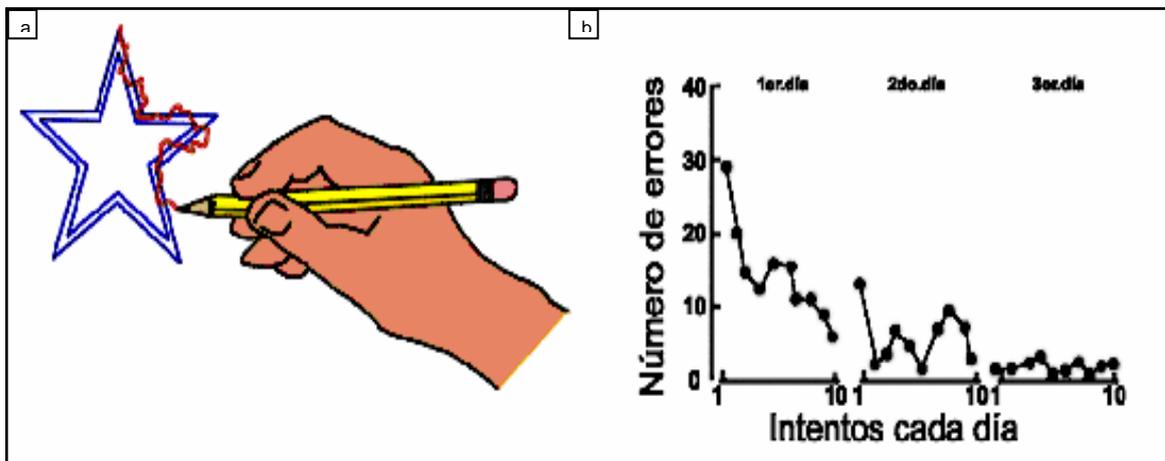


Figura 5. a) Esquema de la tarea de dibujo de la estrella a través del espejo (lado izquierdo). b) Gráfico que muestra el número de veces que, en cada ensayo se salió de las líneas cuando dibujó la estrella (lado derecho). Se puede observar la disminución en el número de errores (Modificado de Kandel, 1997).

En los roedores, la participación del hipocampo en los procesos de aprendizaje y memoria, ha sido ampliamente documentada en los trabajos donde se ha lesionado esta estructura y, se han observado los efectos adversos de las lesiones sobre la ejecución de diversos tipos de tareas. Los laberintos, entre los que se encuentran el laberinto T, el laberinto radial y el laberinto de agua, son las tareas de tipo espacial más comúnmente utilizadas para estudiar los procesos de aprendizaje espacial en ratas (Fig.6).

El aprendizaje de este tipo de tareas espaciales se ve especialmente afectado por lesiones al hipocampo (Wincour y Moscovita, 1990; Volpe, et al., 1992; Olsen et al., 1994), por lo que se ha relacionado con ciertos tipos de memoria declarativa que han sido categorizados por diferentes investigadores como memoria espacial, memoria de trabajo o memoria relacional. Pero además de esto han sido detectados efectos adversos en las tareas que requieren discriminación de estímulos opuestos.

En una serie de interesantes experimentos durante la década de 1970 John O'Keefe y sus colaboradores de la Universidad de Londres registraron

la actividad unitaria en neuronas del hipocampo durante una prueba de memoria espacial, basada en un laberinto de cuatro brazos con el alimento en uno de ellos (brazo meta), rodeado de referencias externas. El escenario completo rotaba 90° tras cada prueba. Las ratas se sometieron a dos pruebas de memoria espacial: perceptual (PMP) y de retraso (PMR). En la PMP se impedía la salida de la rata desde el brazo inicial durante 30-120 seg., mientras el animal observaba referencias externas (periodo perceptual), que se mantenían durante toda la prueba. En la PMR, las referencias se presentaron sólo durante el periodo perceptual, luego se quitaban y a los 60 seg., se permitía que la rata saliera en busca del alimento. Estos investigadores encontraron que un 80% de las neuronas en ambas pruebas disparaban en relación con las referencias externas en el periodo perceptual; en la segunda fase del experimento obtuvieron el registro de una sola neurona quitando las referencias espaciales y encontraron que cuando el animal se colocaba en el laberinto, el disparo de la célula se presentaba en los lugares en los que anteriormente estaban las referencias espaciales. De esta manera demostraron que muchas neuronas en el hipocampo responden selectivamente cuando el medio circundante de la rata se encuentra en una situación novedosa, indicando la situación tanto espacial, como de dirección. Estas células parecen aprender, puesto que, se adaptan a las modificaciones del medio en el que se encuentran los animales, por lo que han sido denominadas células del lugar (O'Keefe y Dostrovsky, 1971; Morris et al., 1982). A partir de estos experimentos fue que O'Keefe y sus colaboradores hicieron el planteamiento de que el hipocampo funciona como proveedor de un mapa de referencia espacial para el resto del cerebro, teniendo la capacidad de especificar información de dirección respondiendo a una serie de estímulos ambientales táctiles auditivos o visuales. Asimismo, es capaz de "anticipar" estímulos novedosos, lo cual nos permite dirigirnos de un lugar determinado a otro (O'Keefe y Dostrovsky, 1971).

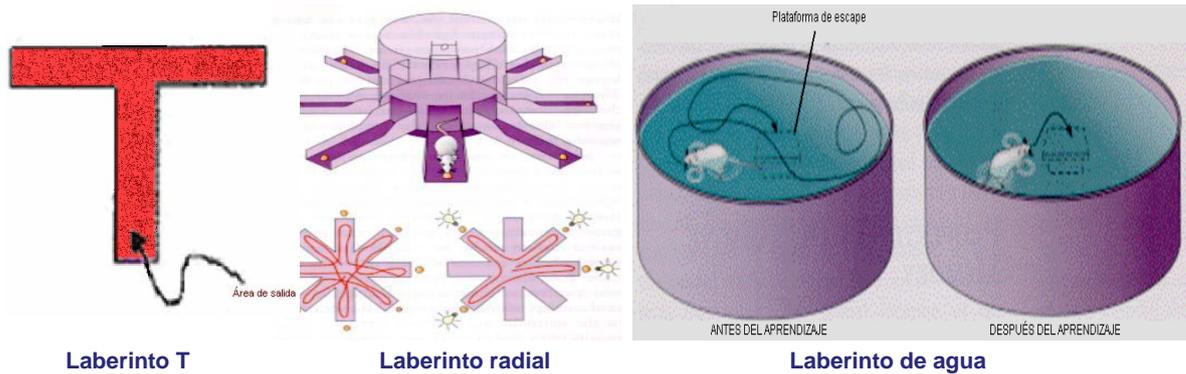


Figura 6. Tareas comúnmente utilizadas para evaluar aprendizaje espacial en roedores (Modificado de Bear et al., 2001).

Las fibras musgosas y los procesos de aprendizaje y memoria.

Las investigaciones que intentan encontrar la relación de la actividad en las fibras musgosas y los procesos de aprendizaje y memoria, se han realizados en varios sentidos. Uno de ellos es la correlación entre el aprendizaje de una tarea espacial y la extensión del campo terminal o de proyección de las fibras musgosas. En este sentido, se ha realizado un procedimiento de selección genética en ratones que producía diferencias significativas en el tamaño del campo terminal en diferentes grupos. Se encontró que, en el laberinto de agua la extensión de la porción infrapiramidal de la proyección de las fibras musgosas se correlaciona negativamente con la latencia de escape en el laberinto de agua (Lipp et al., 1989) y positivamente con el aprendizaje de una nueva localidad de escape en el laberinto de agua y con mayor tiempo de búsqueda de la plataforma (Wahlsten et al, 1991; Bernasconi-Gastalla et al, 1994). La participación de las fibras musgosas y su particular sistema de neurotransmisión en los procesos plásticos en el hipocampo ha sido evidenciada al demostrarse que tanto la activación de las vías aferentes al giro dentado, como la administración de agonistas y receptores NMDA en las células granulares promueven la expresión de ARN mensajero del gen proencefalina y la supresión de expresión constitutiva del gen prodinorfina (Morris y Johnston, 1995). El producto del gen proencefalina, como ya se mencionó da origen a

péptidos afines a los receptores μ y δ , los cuales tienen un efecto excitador sobre las células piramidales de CA3. Este efecto se deriva en la facilitación de transmisión de información de una sinapsis activada directamente (vía patrón perforante-giro dentado) a una no activada directamente (fibras musgosas- células piramidales del CA3), que permitiría que la potenciación de una sinapsis pudiera activar la sinapsis siguiente en el mismo sistema de transmisión de información, facilitando el paso global de información en ese sistema (el circuito trisináptico del hipocampo); (Morris y Johnston, 1995). Lo cual muestra que las células granulares tienen elementos a nivel celular que las convierte en un atractivo candidato para explicar parte de la capacidad plástica del hipocampo. Una tercera área donde se ha encontrado una relación del funcionamiento de las fibras musgosas con los procesos de aprendizaje y memoria es observando la relación de su actividad eléctrica con tareas de aprendizaje. La estimulación de baja frecuencia de las fibras musgosas, por ejemplo afecta adversamente el aprendizaje espacial (Collier y Ruttenberg, 1984; Collier et al, 1987). Por otra parte, se ha observado que el avance en el aprendizaje de una tarea espacial se correlaciona positivamente con la potenciación en las fibras musgosas (Mitsuno et al, 1994). Esta aparente contradicción de efectos parece tener una explicación a nivel de los neurotransmisores: la actividad basal (aumentada por la estimulación de baja frecuencia) de las fibras musgosas, libera dinorfinas, que son inhibitoras de la actividad de las células piramidales de CA3, mientras que la potenciación libera encefalinas, cuyo efecto es excitador (Morris y Johnston, 1995). Estos cambios derivados de los procesos de aprendizaje y memoria, así como el fenómeno de LTP, forman parte de manifestaciones de plasticidad en el SNC.

2.2. Plasticidad sináptica estructural.

La plasticidad sináptica, ha sido definida como los cambios en las propiedades funcionales de las sinapsis como resultado de su uso. En este contexto se considera que expresiones de la plasticidad sináptica tales como cambios en la estructura, distribución y número de sinapsis constituyen parte

de los mecanismos involucrados en la formación de la memoria, en particular a largo plazo (Lamprecht y Le Doux, 2004).

Los estudios sobre la plasticidad sináptica indican que existen dos etapas que se acoplan: el desarrollo del sistema nervioso central (SNC) y el mantenimiento de la solidez de la sinapsis (Marrone y Petit, 2002). La primera etapa está bajo control de procesos genéticos y del desarrollo; la segunda, que se refiere al ajuste por la experiencia de las sinapsis desarrolladas comienza en fases más tardías del desarrollo y se prolonga en cierta medida durante toda la vida (Hosokawa et al., 1995). En la literatura se reconocen diversos mecanismos biológicos de expresión de plasticidad sináptica estructural, tales como, incrementos en la liberación de neurotransmisor, en el número y eficiencia de receptores postsinápticos, asimismo en un mayor número de espinas dendríticas, así como un ensanchamiento de éstas. (Lamprecht y Le Doux, 2004). Se han observado también incrementos en el número de sinapsis (Sorra et al., 1998; Marrone y Petit, 2002; Lamprecht y Le Doux, 2004; Yuste y Bonhoeffer, 2004), lo que implicaría cambios presinápticos y postsinápticos.

En este contexto, uno de los mecanismos que ha tomado interés en la investigación dentro del campo de las neurociencias es el de la *sinaptogénesis*, que se refiere a la modificación de las conexiones sinápticas, en particular a la nueva formación de tales conexiones, como resultado de la actividad. Actualmente se conoce que la formación de contactos sinápticos se lleva a cabo en dos fases esenciales para que pueda efectuarse una comunicación adecuada: la primera consta de la elongación del axón en búsqueda de su contacto sináptico blanco o diana. La segunda consta del establecimiento de contactos estables y funcionales hasta llegar a la diferenciación pre y postsináptica (Garner, et al., 2002). Se ha planteado que estos mecanismos que tienen lugar durante la ontogenia del SN se manifiestan durante la sinaptogénesis adulta (Garrity, 1999). Por otra parte los cambios morfológicos en la eficiencia sináptica se ven también reflejados en diferentes ventanas temporales (Fig. 7) (Toni et al., 1999, Lamprecht y Le Doux, 2004, Yuste y Bonhoeffer, 2004).

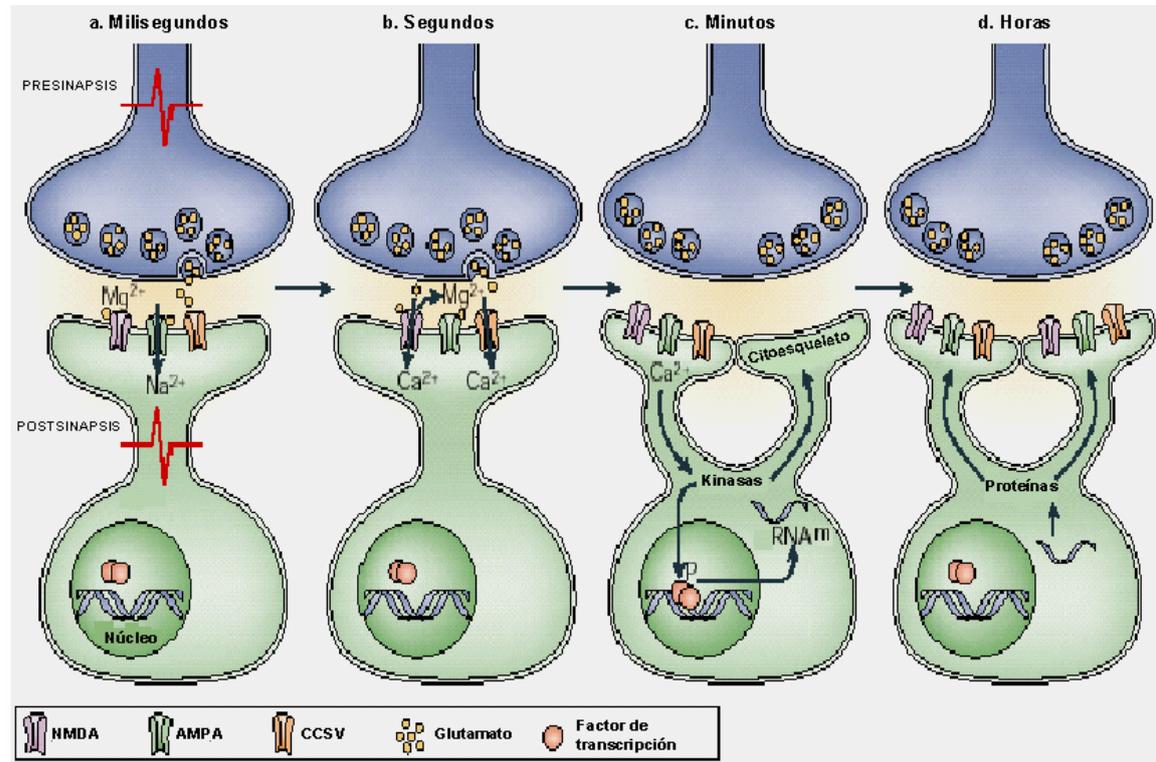


Figura 7. Mecanismos moleculares involucrados en la iniciación y mantenimiento de la plasticidad sináptica. a. La liberación de glutamato dependiente de la actividad en la presinapsis lleva a la activación de los receptores AMPA (α -amino-3-hidroxi-5metil-4 ácido isoxazolo propiónico) y la depolarización de la membrana postsináptica. b. La depolarización de la neurona postsináptica provoca que el ion de magnesio que bloqueaba al receptor NMDA (N-metil-D-aspartato) se mueva y entre calcio por éste receptor. La depolarización también activa a los canales de calcio sensibles a voltaje (CCSV), que son otra fuente para la entrada de calcio. c. El calcio que entró a la neurona postsináptica activa a proteínas quinasas, las cuales modulan la actividad de sus sustratos, estos contribuyen a cambios locales en la sinapsis así como la alteración morfológica a través de la regulación del citoesqueleto o inducen la transcripción de RNA puesto que fosforilan factores de transcripción que están en el núcleo. d. La transcripción de RNA mensajero es traducida en proteínas que contribuyen en la estabilización de los cambios sinápticos. (Modificado de Lamprecht y Le Doux, 2004)

2.2.1. Sinaptogénesis en mamíferos adultos dependiente de la actividad.

Cuando un organismo aprende, al actividad eléctrica generada por la tarea a que fue sometido, modifica la redes de interconexión entre las neuronas, de tal forma que la información perteneciente a este tipo de aprendizaje queda *grabada* en la arquitectura de la red (Wong, 1997). Esto quiere decir que para observar cómo el SNC almacena información, es cuestión de buscar los cambios en las diferentes redes nerviosas como

consecuencia de su actividad. No obstante, dado el número de conexiones que una neurona puede tener en un cerebro mamífero adulto, es evidente la complejidad de las redes resultantes, con millones de nodos y conexiones. De ahí la dificultad de relacionar un reposo de aprendizaje tanto con la actividad eléctrica específica del mismo, como las modificaciones estructurales en la red que resultan de éste y que presumiblemente lo mantienen.

Sin embargo, se conocen algunas características que relacionan la actividad en una parte del cerebro con modificaciones en esta zona. Por ejemplo, se conocen las ventanas temporales en que un paquete de información relacionado a un aprendizaje específico está aun en su fase eléctrica (cuando está presente en la actividad eléctrica de la red) y cuando ya se encuentra grabado en la arquitectura de la red (es decir, cuando ya ha habido modificaciones sinápticas). Dada la labilidad de la fase eléctrica, al someter a un animal a choques electroconvulsivos un determinado tiempo (normalmente menos de 30 minutos) después de que aprendió una tarea éste, al recuperarse de la electroconvulsión, no recuerda la tarea; sin embargo, si las convulsiones suceden a en un lapso de tiempo mayor al anterior (unas horas después), el animal recuerda perfectamente la tarea (Buresova y Bures, 1979). Lo anterior ha hecho pensar que las modificaciones en el SNC que permitían este almacenamiento no lábil de la información serían de tipo estructural de los patrones sinápticos, los cuales serían resultado de la actividad eléctrica inespecífica subsecuente, representada por lo choques electroconvulsivos, teniendo un carácter de mayor permanencia.

Estudios como el descrito anteriormente, han promovido la búsqueda de evidencias en el sentido de que el SNC pueda, en efecto modificar los patrones de conexión en sus redes como consecuencia de algún tipo de actividad eléctrica nerviosa. Y ciertamente, se ha encontrado que las modificaciones en la actividad eléctrica nerviosa tienen consecuencias sobre los patrones sinápticos en el SNC. Los efectos más dramáticos han sido

observados en las preparaciones experimentales de modelos de epilepsia y fundamentalmente en las fibras musgosas.

En modelos de epilepsia experimental utilizando *kindling* eléctrico (proceso empleado para inducir actividad convulsiva crónica en animales) o la inyección de agentes convulsivos como la pilocarpina o el kainato, se han logrado detectar cambios masivos en los patrones sinápticos de las fibras musgosas. Gran parte de estos estudios (Lee et al., 1980; Sutura et al., 1988; Cavazos et al., 1991; Mello et al., 1993; Represa et al., 1993; Ebert y Löscher, 1995; Okazaki et al., 1995; Wuarin y Dudek, 1996) han observado la aparición de grandes cantidades de botones sinápticos de las fibras musgosas en la capa molecular del giro dentado, región en la cual son normalmente inexistentes. Asimismo Represa y Ben-Ari (1990, 1992), detectaron reorganización sináptica hacia la zona de las dendritas basales de las células piramidales del CA3 (estrato oriens) tanto con *kindling* eléctrico como la inyección de agentes convulsivos. En pacientes con epilepsia de lóbulo temporal, también se ha encontrado reorganización sináptica de las fibras musgosas hacia la capa molecular del giro dentado (De Lanerolle et al., 1989; Houser et al., 1990; Frank et al., 1995). Este tipo de sinapsis aberrantes o ectópicas, como les denominaron Ben-Ari y Represa (1990), han sido detectadas generalmente utilizando la técnica de Timm; aunque estos hallazgos han sido también corroborados utilizando otras técnicas como Golgi (Represa y Ben-Ari, 1992), trazadores de vías neurales (Frank et al., 1995; Okazaki et al., 1995) o microscopia electrónica (Represa et al., 1993).

La actividad epiléptica ha logrado relacionarse con la LTP al observarse que después de actividad convulsiva en rebanadas de hipocampo, se logra observar una facilitación de la transmisión sináptica muy semejante a la LTP (Ben-Ari y Gho, 1988; Aniksztejn et al., 1991). Esto parece indicar que en el hipocampo, la inducción de la actividad de disparo epileptogénica podría involucrar mecanismos similares a los involucrados en la plasticidad sináptica en el caso de la LTP (Represa et al., 1994), los cuales generan nuevas conexiones.

La sinaptogénesis, como se ha mencionado anteriormente, incluye procesos como la formación de nuevas espinas dendríticas y la elongación de las mismas (Adams, et al, 1997, Yuste y Bonhoeffer, 2004). Este proceso ha sido observado en diversos estudios uno de ellos es el paradigma de enriquecimiento ambiental. Rosenzweig (1964) realizó estudios experimentales en animales, en los cuales demostró que los ambientes enriquecidos (una combinación de estimulación externa que consta tanto de objetos novedosos y estimulantes, como de la interacción social); inducen cambios morfológicos (especialmente relacionados con neurogénesis y sinaptogénesis) fisiológicos, neuroquímicos y conductuales (Nilsson et al., 1999; Kempermann y Gage; 2000; van Praag et al.; 2002).

Se han observado cambios morfológicos gruesos, como aumentos en el grosor de algunas secciones de la neocorteza de mamíferos adultos (Diamond et al., 1967; Zito y Svoboda, 2002) como la corteza frontal de rata (Nakamura et al. 1999) y en la densidad sináptica de todo el cerebro (Saito et al., 1994), como consecuencia de tareas de aprendizaje y memoria, así como a la estimulación tetánica. Este aumento en la densidad sináptica también se encontró localmente en la corteza visual de ratas (Turner y Greenough, 1985) correspondiente a un aumento de densidad neuronal como resultado de estimulación sensorial. Knott et al., 2002, reportaron un aumento en las espinas dendríticas en corteza somatosensorial de ratas debido a la estimulación en vibrisas. Otras observaciones más finas han revelado incrementos en el número de ramas dendríticas por neurona, en la corteza visual de ratas (Volkmar y Greenough, 1972) o en la corteza visual, somatosensorial y motora en monos (Bryan y Riesen, 1989; Kleim et al., 2002), como resultado de la ejecución adecuada en tareas de aprendizaje. Asimismo se ha observado que la estimulación temprana provoca un aumento en la tasa de producción de las células granulares (alrededor del 15%) y confirmando los hallazgos anteriores, aumento en la cantidad de células gliales en el giro dentado así como en el grosor de la misma región (Kempermann et al., 1997). Ramírez-Amaya et al. (1999) encontraron que el sobreentrenamiento en tareas de aprendizaje espacial, origina incrementos

en las conexiones sinápticas de las fibras musgosas del hipocampo. Se ha observado que no solo la estimulación y el aprendizaje dan lugar a la formación de nuevas sinapsis, también se ha reportado sinaptogénesis posterior a daño en el sistema nervioso central (Carmichael, 2003); en la enfermedad de Alzheimer (Scheff, 2003); en la epilepsia (Ratzliff et al., 2002 y Lynd-Balta et al., 2004) y en el modelo experimental de ésta última (el kindling) (Represa y Ben-Ari, 1992; Adams et al., 1997; Routbort et al., 1999).

En el hipocampo son numerosos los estudios en los que se han reportado aumentos en la cantidad de ramas dendríticas de las células granulares (Adams et al., 1997; Routbort et al., 1999; Verderio et al. 1999, Segal, 2005), así como en el número de células gliales y piramidales (Field et al., 1997; Parnass et al., 2000; Longo et al. 2003; Peng et al. 2003) como consecuencia de la inducción de potenciación a largo plazo y actividad epileptógena. Lo anterior, muestra en conjunto que el SNC puede modificarse de forma activo-dependiente, donde la actividad es resultado de la experiencia y estimulación externa a la que son sometidos los organismos, lo cual tiene, a su vez, efectos posteriores en la conducta (Genismann, 2000 van Praag et al., 2002; Shors, 2004).

El hipocampo ha sido una estructura fundamental en el conocimiento de los procesos de aprendizaje y memoria, que exhibe una gran capacidad plástica. Las fibras musgosas, como subregión del hipocampo, tienen características especiales, como mencioné en líneas anteriores, que las hacen útiles para la evaluación de la plasticidad en el SNC y su relación con los procesos de aprendizaje y memoria.

Existen tres razones fundamentales por las que esta proyección ha sido estudiada extensamente en relación a las modificaciones estructurales que experimenta. La primera es consecuencia de la anatomía laminar del hipocampo, lo cual permite que esta subregión pueda ser marcada de forma aislada y, sea fácilmente observable dado el ordenamiento altamente delimitado que existe entre las diferentes subregiones o grupos celulares (Fernández Espejo, 1996). La segunda razón, es que sus botones sinápticos terminales son muy grandes y numerosos, fácilmente visibles con la

utilización de la técnica argéntica de Timm, que aprovecha las grandes cantidades de zinc que contienen. Además, son fácilmente identificables en el microscopio electrónico, así como las técnicas de trazado como la biocitina o el amarillo lucifer inyectados por iontoforesis, o técnicas inmunocitoquímicas para péptidos opioides (Ben-Ari y Represa, 1990). La tercera, es la susceptibilidad que tienen las fibras musgosas frente a los cambios en la actividad eléctrica a la que son sometidos en diversas preparaciones experimentales, en especial, aquellas relacionadas a la actividad convulsiva. Esta susceptibilidad frente a manipulaciones que afectan su actividad las hace útiles como modelo de plasticidad del sistema nervioso (Ben-Ari y Represa, 1990; Krestchatsky, et al, 1995). Por estas razones, se han estudiado intensamente las condiciones en que las fibras musgosas cambian sus patrones sinápticos, con el propósito de elucidar los mecanismos desde el nivel celular hasta el anatómico, que son utilizados para la modificación de la conformación sináptica. Este tipo de explicaciones tiene el objetivo final de lograr describir adecuadamente como el SN almacena información por medio de la modificación de sus conexiones, no solamente de tipo espacial y localizada en el hipocampo, sino cualquier clase de información en cualquier parte del cerebro.

La mayoría de las células granulares, y por ende, de las fibras musgosas, se forman en la rata después del nacimiento, durante los 28 días de la vida postnatal (Gaarskjaer, 1986). Este proceso de crecimiento sufre alteraciones ante la disminución en la disponibilidad de nutrientes, principalmente de proteínas. Los efectos más notorios de la desnutrición postnatal en animales jóvenes (Bedi, 1991; DeBassio et al, 1994), como en adultos (Andrade et al., 1995) para el hipocampo, radican en la disminución definitiva en el número de células granulares del giro dentado, efecto que se mantiene a pesar de la rehabilitación nutricional posterior. La disminución definitiva en el giro dentado en los animales adultos provoca cambios plásticos importantes en las fibras musgosas ante la rehabilitación nutricional, los cuales permiten recuperar el área de contacto sináptico inicial entre las fibras musgosas y las células piramidales del CA3 (Andrade et al., 1996).

Se conoce que durante los periodos postnatales tempranos, el sistema nervioso aún se encuentra generando gran cantidad de neuronas y está en un proceso activo de reorganización sináptica. Se sabe también, que algunos de estos procesos son dependientes de la estimulación sensorial que recibe el organismo. Gran parte de esto se ha sabido a través de experimentos realizados en la vía visual. Uno de estos experimentos, es el realizado por Hubel y Wiesel en los años setenta, en el cual estos investigadores cerraron los párpados de gatos recién nacidos y hallaron bastaba una semana de ceguera para perturbar la formación de columnas de dominancia ocular. Muchos investigadores han seguido esta línea y se han preocupado por explorar el efecto que tiene la estimulación diferencial sobre la conformación del SNC durante este periodo crítico (Shatz, 1992).

Las modificaciones estructurales, como se ha observado, pueden ser consecuencia directa de la actividad fisiológica normal, relacionada con los procesos de codificación de memoria, estableciéndose así un importante nexo entre los hallazgos electrofisiológicos y conductuales, a lo largo de la escala filogenética.

2.3. Potenciación a largo plazo.

2.3.1. Características generales.

La memoria, se refleja en la capacidad de las neuronas para modular las respuestas evocadas por un estímulo y para reactivar una respuesta en ausencia del estímulo que la originó (Eichenbaum, 1997). Los mecanismos moleculares de la plasticidad sináptica se han relacionado con cambios en la eficacia sináptica que duran semanas, meses o años; estos cambios se han propuesto como explicaciones potenciales del almacenamiento de información. Uno de los grandes avances en la elucidación de los mecanismos involucrados en el almacenamiento de información en el SNC es la potenciación a largo plazo (LTP, por las siglas en inglés). En 1973 Bliss y Lomo encontraron que breves trenes de alta frecuencia aplicados a las aferentes excitatorias del hipocampo de conejos, causaban un incremento en la fortaleza de la transmisión sináptica que podía durar días e incluso

semanas en animales intactos, a lo que le llamaron, potenciación a largo plazo, que es un modelo celular que ayuda a comprender los mecanismos que lleva a cabo el cerebro para almacenar información.

La LTP posee características que la convierten en un protocolo valioso para explicar los eventos que a nivel celular, bioquímico y molecular subyacen a la plasticidad sináptica relacionada con la memoria, éstas son: la *especificidad*, que se refiere a que, solamente aquellas fibras que fueron activadas por el estímulo de alta frecuencia van a presentar modificaciones en la respuesta sináptica; la *cooperatividad*, se manifiesta por un fuerte requerimiento en la activación simultánea de las fibras presinápticas, de tal modo que se logre el estímulo necesario para activar la LTP, y la *asociatividad*, que se ha observado cuando una vía que ha sido estimulada por una señal de baja frecuencia, puede ser potenciada si se activa al mismo tiempo que otra vía es estimulada por una señal de alta frecuencia, siempre y cuando ambas sean convergentes a la misma área (Fig.8) (Bliss y Collingridge, 1993; Bailey et al., 2000). Para algunos investigadores como Hebb, la memoria debía ser almacenada a través de la formación de conexiones asociativas entre neuronas involucradas, sin embargo, se han observado eventos de LTP descritos como no asociativos. La LTP que requiere una activación coincidente de los elementos pre y postsinápticos es denominada LTP hebbiana, mientras aquella que no requiere la activación de dichos elementos es llamada no hebbiana (Urban y Barrionuevo, 1996).

En el hipocampo se ha logrado inducir LTP en varias vías como lo son la del patrón perforante (Bliss y Lomo, 1973; Doyere et al., 1997; Roberts et al., 1997), las colaterales de Schaffer (Debanne et al., 1996; Wang y Steltzer, 1996; Abraham y Hugget, 1997), de la vía de las fibras comisurales al área CA3 (Bliss y Collingridge, 1993), del área CA1 al subiculum (Commins et al., 1998) y las fibras musgosas (Derrick et al., 1991; Nicoll y Malenka, 1995; Adams, 1997; Escobar et al., 1997). Así mismo ha logrado inducirse la LTP en varias regiones de la neocorteza (Artola y Singer, 1990; Tsumoto, 1992; Bear y Kirkwood, 1993; Escobar et al., 1998; Calabresi et al., 2000; Losi et al., 2002; Lynch, 2004).

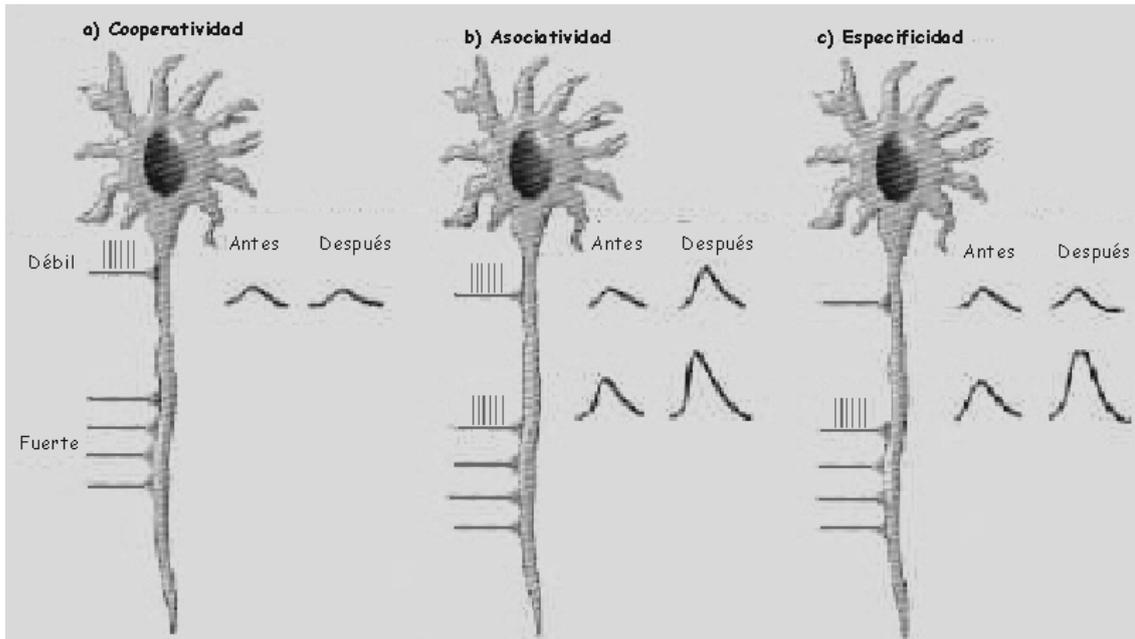


Figura 8. Características de la potenciación a largo plazo. Esquema representativo de las características de la LTP; a) Cooperatividad, una vía débil no puede ser potenciada sola; b) Asociatividad, una vía débil asociada a una vía fuerte presenta potenciación y c) Especificidad, solo la vía que fue estimulada va a ser potenciada.

La relación de este fenómeno con los procesos de almacenamiento de información ha sido profusamente estudiada en el hipocampo y otras regiones del SNC. Algunos puntos que hacen pensar a los investigadores que la LTP y los procesos de aprendizaje y memoria son similares, son que la LTP puede operar en redes de neuronas, a las cuales se ha visto involucradas con procesos de aprendizaje y memoria, como el hipocampo, la amígdala, la neocorteza, entre otras, y además dura un lapso de tiempo prolongado y funciona de manera similar al postulado de Hebb (Martínez y Derrik, 1996). Un ejemplo clásico al respecto es el estudio de Morris en 1989, en el cual la interrupción de la transmisión sináptica dependiente de los receptores NMDA en ratas, ocasionó el bloqueo tanto del aprendizaje en la tarea espacial del laberinto de agua, así como de la inducción de la LTP hipocampal. En evidencias similares se ha encontrado un incremento en

tareas de aprendizaje con ratones transgénicos que sobreexpresan una subunidad de los receptores NMDA, (Tang et al., 1999).

El bloqueo de la actividad de otras proteínas necesarias para la LTP, tales como las proteínas cinasas PKA (proteína cinasa dependiente de AMP cíclico), PKC (proteína cinasa C), CaMK-II (Calcio-calmodulina-cinasa-II), también implicadas en el establecimiento o mantenimiento de la potenciación a largo plazo, interfieren en mayor o menor grado con la solución de tareas espaciales (Malenka, 1994; Mayford et al., 1995; Mayford et al., 1996). Por otra parte, al igual que el mantenimiento de la LTP por periodos prolongados, la consolidación de la información es dependiente de la transcripción de proteínas (Davis y Squire, 1984; Mathies, 1989) tanto en invertebrados (Montarolo et al., 1986; Tully, 1991), como en mamíferos (Davis y Squire, 1984; Abel et al., 1997). Algunos estudios sugieren que tanto el almacenamiento de información como la LTP utilizan vías de transducción similares para la regularización de la expresión genética. Se ha encontrado que la actividad de la cinasa PKA es necesaria para la consolidación de la información (Huang et al., 1994; Abel et al., 1997). Asimismo se requiere de la activación de la expresión de genes dependientes del factor de transcripción CREB (proteína responsiva a la unión de AMP cíclico), para la consolidación como la *Aplysia californica* (Dash et al., 1990), *Drosophila melanogaster* (Yin et al., 1994) y en mamíferos (Kogan et al., 1997). A pesar de que todavía existen dudas acerca de la relación de la LTP y los procesos de aprendizaje y memoria, ha sido un modelo muy útil para estudiar los mecanismos moleculares que conforman a la plasticidad sináptica (Martin y Morris, 2002).

La evidencia hasta el momento más sólida a favor de una relación entre el fenómeno de la LTP y el aprendizaje, proviene de dos estudios realizados por dos grupos independientes en la amígdala (McKernan y Shinnick-Gallagher, 1997; Rogan et al., 1997). Los estudios de ambos trabajos sugieren que el condicionamiento al miedo, causa incrementos de largo plazo en la eficiencia sináptica en la vía que transmite información auditiva del núcleo geniculado medial del tálamo a la amígdala lateral. Rogan

y su grupo (1997) demostraron *in vivo* que el condicionamiento al miedo produce incrementos en la pendiente y la amplitud de los potenciales postsinápticos excitatorios (PPSE's) en la amígdala lateral de ratas adultas, similares a los vistos después de inducir LTP *in vivo*. Por otra parte McKernan y Shinnick-Gallagher (1997) demostraron que el entrenamiento al condicionamiento al miedo produce una facilitación presináptica de la amígdala lateral en preparaciones *in vitro*, 24 hr después del entrenamiento en ratas adultas de dicha tarea. Trabajos anteriores habían mostrado el papel de la amígdala en el condicionamiento al miedo, y la LTP se había propuesto como el candidato a ser el mecanismo celular del aprendizaje (Maren, 1996). Es posible suponer que estos estudios realizados en la amígdala promoverán la realización de estudios similares en otras regiones del sistema nervioso en las que es posible inducir LTP y que se encuentran asociadas al aprendizaje de alguna tarea. Otros casos que cumplen con estos requerimientos son el condicionamiento al parpadeo, en el que se encuentra implicado el cerebelo y el aprendizaje motor en el que participan la corteza sensorial y el tálamo (Asanuma y Pavlides, 1997; Leuner et al., 2003), por ser tipos de aprendizaje sencillos, para los que se conocen a bien los circuitos nerviosos implicados.

2.3.2. Mecanismos moleculares de la LTP.

Los mecanismos moleculares que subyacen al establecimiento y mantenimiento de la LTP han sido ampliamente estudiados en las vías hipocámpales, particularmente en la vía de las colaterales de Schaffer en la región CA1. Actualmente se conoce que los mecanismos similares tienen lugar en regiones neocorticales (Lu, et al., 1997; Vickery et al., 1997; Heynen y Bear, 2001). Las vías excitatorias en el hipocampo, al igual que en muchas otras zonas del sistema nervioso, utilizan glutamato como neurotransmisor (Kennedy y Marder, 1992). En experimentos realizados con antagonistas de los receptores NMDA, como el AP5, los cuales impiden la activación de éstos receptores, se ha observado que no es posible inducir LTP (Collingridge et al., 1983; Harris et al., 1984). Los receptores NMDA se encuentran generalmente inactivos; durante la actividad normal de las conexiones

sinápticas, las terminales presinápticas liberan glutamato en el espacio extracelular y este neurotransmisor activa a los receptores AMPA/kainato de la célula postsináptica, dando lugar a la entrada de sodio al interior de la célula. Los receptores NMDA, también responden a glutamato, pero se encuentran bloqueados por iones de magnesio, lo que impide el flujo de iones a través de ellos. Para eliminar tal bloqueo, es necesaria la depolarización de la membrana, lo cual ocurre por la entrada de cationes a través de otros canales como el tipo AMPA (Kandel y Hawkins, 1992). Esto proporciona a los receptores NMDA la propiedad de funcionar como detectores asociativos, ya que se activan sólo cuando coinciden la actividad de la célula presináptica y la depolarización de la membrana en la célula postsináptica (Bliss y Collingridge, 1993; Malenka, 1994). Los receptores NMDA tienen además la característica de que al ser activados permiten, no solamente la entrada de iones de sodio al interior de la célula, sino que también son permeables a la entrada de iones de calcio (MacDermot et al., 1986; Jahr y Stevens, 1987; Ascher y Nowak, 1988). Es la entrada de calcio, a través de estos canales, así como de los canales de calcio sensibles a voltaje (Henze et al., 2000), lo que hace posible la presencia de la LTP, al ocasionan cambios en el interior de la célula. La entrada de calcio a la célula postsináptica, a través de los receptores NMDA, activa a la proteína citosólica llamada calmodulina, la cual funciona como una señal al activar distintas vías de traducción al interior de la célula, haciendo posible el mantenimiento del incremento en la eficiencia sináptica por periodos prolongados de tiempo (Kennedy y Marder, 1992). En 1989 Robert Malenka y sus colaboradores demostraron la importancia de las proteínas cinasas (las cuales, se caracterizan por transferir un grupo fosfato a sus substratos) en la potenciación a largo plazo; encontraron que la LTP se bloquea con la administración de inhibidores de la actividad de las proteínas cinasas. Además, de que el mismo bloqueo se obtiene con el uso de inhibidores específicos de las proteínas cinasas dependientes de calcio, como la trifluoperacina y camidazolium, (Malenka et al., 1989). Por otra parte Kennedy y su grupo demostraron el papel central que juega la proteína

CaMK-II, mediante la introducción de antagonistas de esta proteína. Sin embargo, el papel explícito que juega la CaMK-II en el incremento de la eficiencia sináptica fue descrito en 1997 por Barria y sus colaboradores cuando demostraron que su activación se correlaciona con un aumento en los niveles de fosforilación de los receptores AMPA; gracias a este estudio fue posible plantear por primera vez un modelo de los cambios a nivel molecular que tienen lugar durante la inducción de la LTP que permite su mantenimiento, al menos en el mediano plazo.

Se ha demostrado que el mantenimiento de la LTP por periodos prolongados (mayores a una hora) es dependiente de la transcripción de proteínas (Nguyen et al., 1994). Si se bloquea la transcripción de ARN mensajero o la traducción de proteínas, el efecto de la potenciación decae después de una hora. No obstante, si el bloqueo se realiza después de la inducción a la potenciación, éste se mantiene durante la totalidad del registro, sugiriendo que la producción de proteínas, para mantener el aumento de la fortaleza sináptica, ocurre en una determinada ventana de tiempo.

En los últimos años se ha determinado que la entrada de calcio, por intermediación de la proteína calmodulina, causa entre otras cosas, la activación de la glicoproteína adenilato ciclasa, esta proteína produce AMP cíclico a partir de moléculas de ATP (Kennedy y Marder, 1992). Este nucleótido es utilizado como mensajero en un sinnúmero de cascadas de transducción celular. Durante la inducción de la potenciación a largo plazo, el AMP cíclico (cAMP) producido, activa a la proteína cinasa PKA. Huang et al., en 1994 mostraron que la LTP decae si la actividad de esta proteína es bloqueada. Cuando la PKA es activada, ocurre la disociación de su unidad reguladora de la catalizadora, permitiendo la translocación de la segunda al interior del núcleo (Hagiwara et al., 1993). Una vez en el interior transfiere grupos fosfato para la activación de factores de transcripción como CREB (Hagiwara et al., 1993), que participa en la modulación de la transcripción de una gran variedad de genes que contienen sitios sensibles a ella, denominado CRE (elemento responsivo al cAMP) (Silva et al., 1998). De hecho a través de la administración de análogos y agonistas del cAMP se ha

probado la participación decisiva de este segundo mensajero en el mantenimiento prolongado de la LTP (Fig. 9), (Huang et al., 1994).

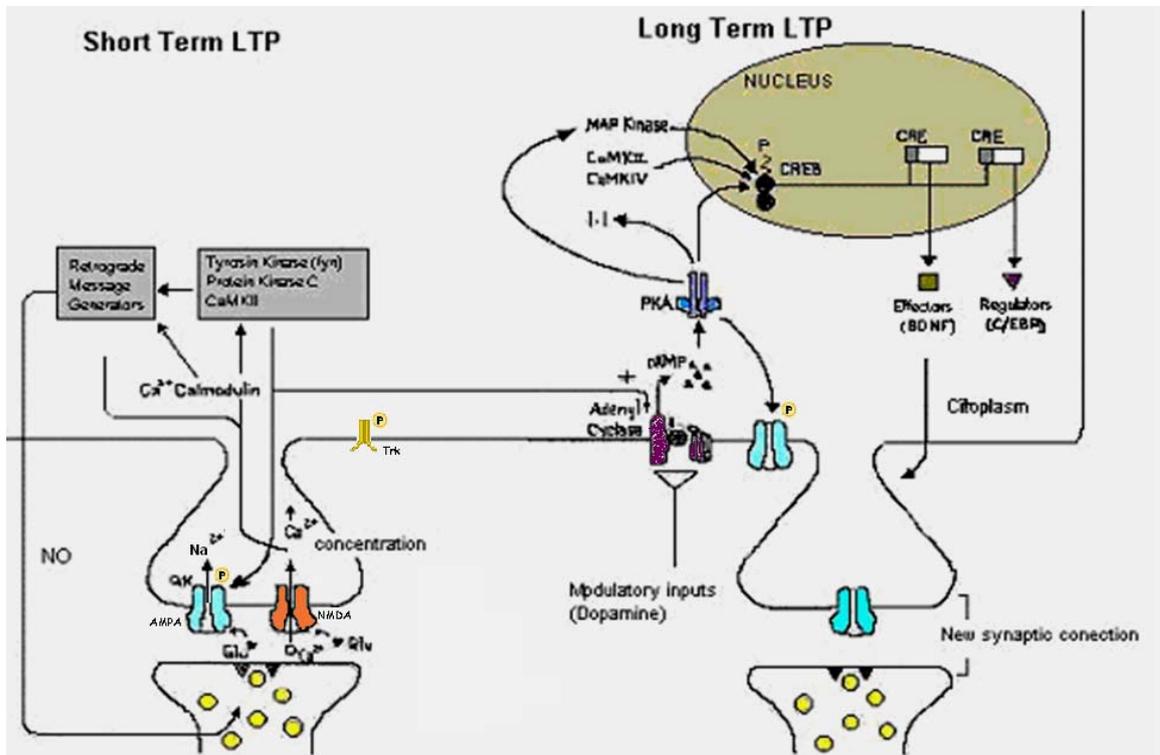


Figura 9. Mecanismos moleculares que subyacen a la potenciación a largo plazo dependientes de los receptores NMDA. A la izquierda se esquematizan las cadenas metabólicas desencadenadas en el corto plazo de la LTP y a la derecha, los mecanismos que subyacen al largo plazo de la LTP (modificado de Huang et al., 1996).

Sin embargo, se sabe que en las fibras musgosas existe una escasa cantidad de receptores NMDA y además se ha visto que los antagonistas a éstos receptores no bloquean la expresión de la LTP en ésta área, como sucede en otras (Escobar et al., 1997, Thompson et al, 2005), por lo cual para explicar los mecanismos moleculares de la LTP en esta área se ha visto implicada la participación de los receptores de calcio sensibles a voltaje, los cuales desencadenan la activación de proteínas cinasas que pueden translocar al núcleo para dar lugar a la síntesis proteica (Fig. 10); asimismo se relaciona dentro de los mecanismos de la LTP en las fibras musgosas a la modulación por parte de péptidos opioides y la participación en la postsinápsis de los receptores metabotrópicos, en especial los mGlu 1 y en

la presinapsis la proteína Rab 3A, asociada con la liberación de neurotransmisor (Morris y Johnston, 1995; Castillo et al., 1997; Escobar et al., 1997; Henze et al., 2000; Nicoll y Schmitz, 2005, Thompson et al, 2005).

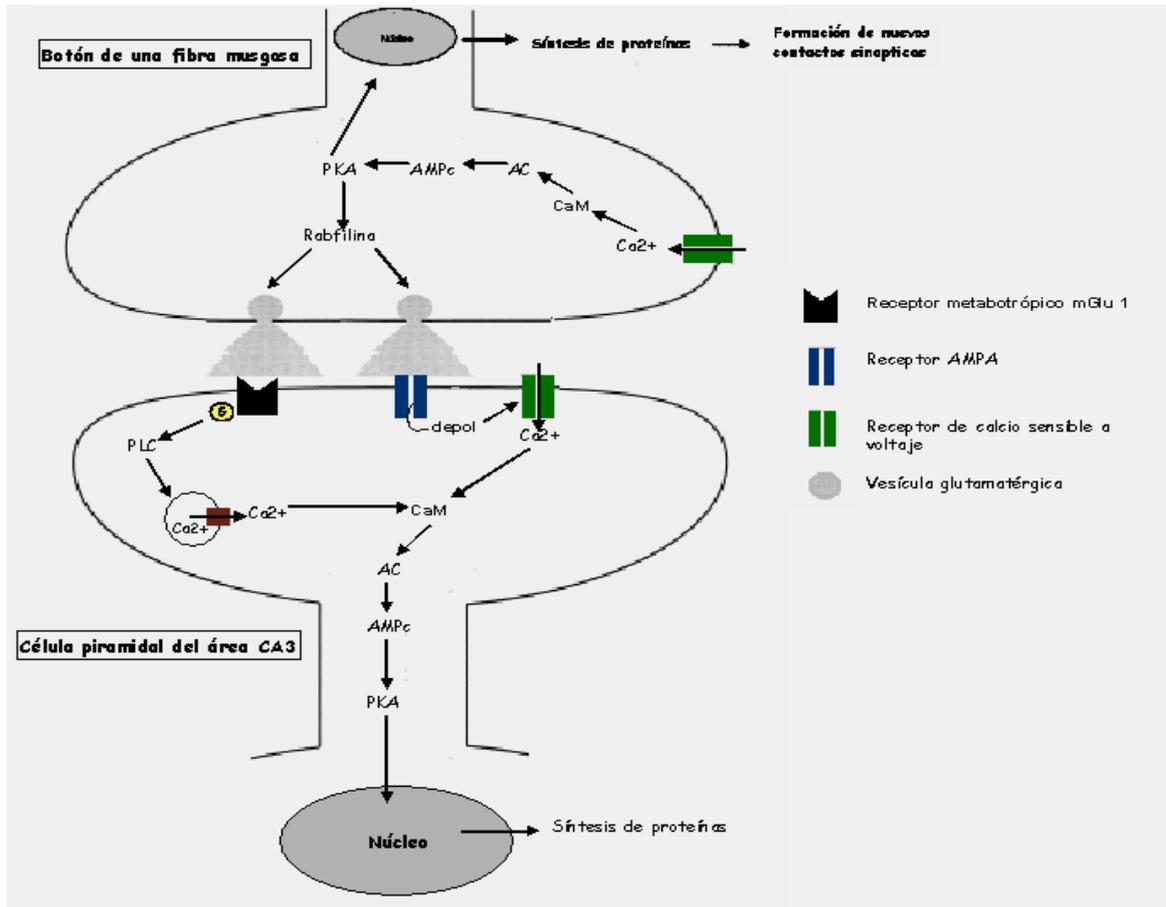


Figura 10. Mecanismos moleculares que subyacen a la potenciación a largo plazo en las fibras musgosas. (Modificado de Henze et al., 2000).

Durante la LTP, las espinas dendríticas juegan un papel importante como sitios potenciales para los cambios morfológicos (Yuste y Bonhoeffer, 2004, Segal, 2005). En la corteza cerebral como en otras estructuras cerebrales de los mamíferos, la mayoría de las sinapsis excitatorias aferentes se establecen en las espinas dendríticas; por lo que las espinas dendríticas juegan un importante papel funcional en la regulación de la eficacia sináptica. Numerosos estudios demuestran cambios en las espinas dendríticas tras la inducción de LTP, por ejemplo Hosokawa et al. (1995), reportaron un

incremento en el número de dendritas posterior a la inducción de LTP, así también Genisman (2000) reportó un incremento en el número de espinas dendríticas en tejidos hipocampales después de emplear el condicionamiento de parpadeo. Por otra parte Toni et al. (1999), mediante la aplicación de LTP hipocampal, obtuvieron cambios en la morfología de las espinas dendríticas y el brote de nuevos botones. Se ha visto también que la estimulación tetanizante inductora de LTP, es capaz de dar lugar a la formación de nuevas espinas en el estrato oriens de las fibras musgosas del área CA3 en ratas adultas a través de la técnica histoquímica de Timm (Escobar et al.1997; Adams et al., 1997; Thompson, 2000). Asimismo Ramírez-Amaya et al., en 1999 y posteriormente en el 2000 observaron el proceso de sinaptogénesis en las fibras musgosas como resultado en el entrenamiento de una tarea espacial.

Las investigaciones citadas anteriormente, apoyan la idea de que los cambios en las conexiones neuronales se encuentran implicados en los procesos de aprendizaje y memoria. No obstante, el dilucidar dichos cambios ayudará a tener una mejor comprensión del sustrato biológico de tales procesos plásticos.

3. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN

Conocer las bases biológicas que expliquen procesos como el aprendizaje y la memoria, nos proporciona una visión más clara acerca del comportamiento de los seres vivos. A lo largo de los años las investigaciones al respecto han ido formando la concepción de que el modelo de LTP y las modificaciones estructurales que ella origina, contribuyen al entendimiento de los mecanismos biológicos que subyacen a los procesos mnémicos.

Existen numerosos estudios que destacan la participación de la reorganización estructural de la sinapsis como parte de los procesos involucrados en el almacenamiento de información por tiempos prolongados. Sin embargo, el conocimiento en torno al curso temporal del inicio y la permanencia de tales modificaciones es aún incipiente. En este contexto, el presente estudio pretende caracterizar el curso temporal de las modificaciones sinápticas, empleando para ello el modelo de reorganización sináptica de las fibras musgosas que van del giro dentado hacia al área CA3 del hipocampo, dicha reorganización se deriva de la inducción de potenciación a largo plazo *in vivo* en ratas adultas.

4. OBJETIVOS

En base a lo planteado en los antecedentes, la presente investigación pretende:

- Caracterizar el curso temporal de la sinaptogénesis hipocampal producida tras la inducción de la LTP en el patrón que va del giro dentado al área CA3 en ratas adultas *in vivo*, mediante la técnica histoquímica de Timm.
- Evaluar y discutir los resultados a la luz de las investigaciones en torno a las bases del almacenamiento de información en el sistema nervioso.

5. METODOLOGÍA

5.1. Sujetos

Para la presente investigación se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con pesos entre 360 y 390g, Los sujetos experimentales tuvieron un periodo de habituación a las condiciones del bioterio de una semana, se mantuvieron en cajas individuales de acrílico y estuvieron bajo un ciclo de luz-oscuridad 12h/12h, a una temperatura promedio de 23°C; con comida y agua *ad libitum*.

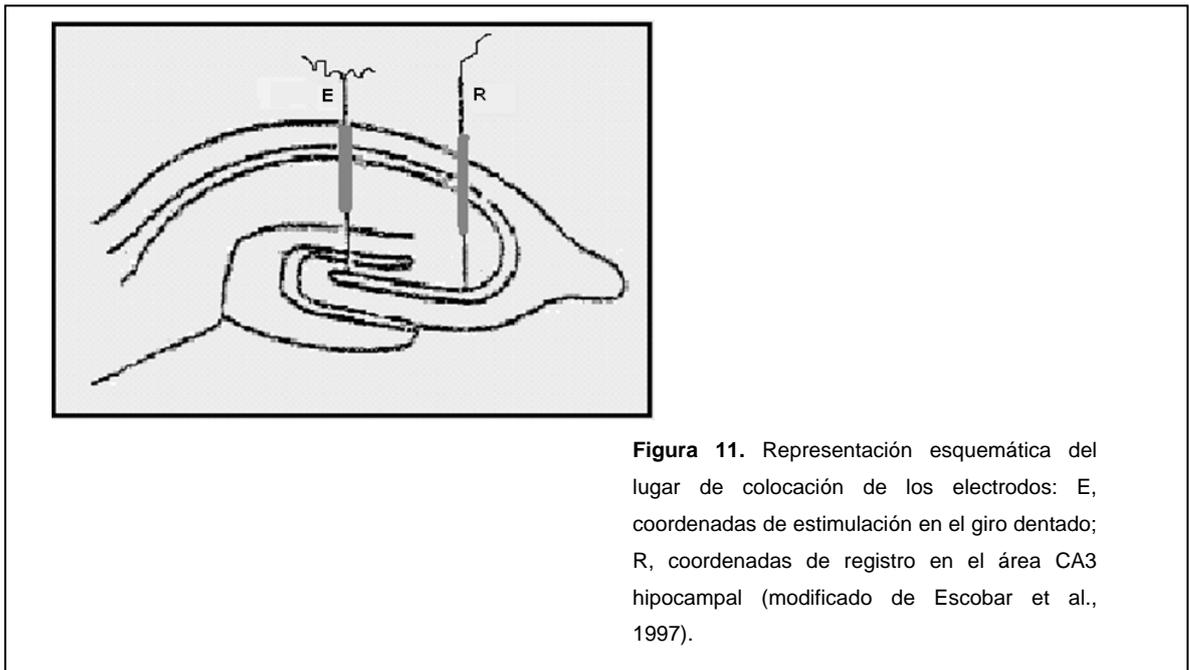
5.2. Electrofisiología

En los procedimientos quirúrgicos y electrofisiológicos, los animales fueron anestesiados con pentobarbital (50 mg/kg IP), y se les suministraron inyecciones suplementarias del mismo (25 mg/kg) a intervalos de 1 hr a fin de mantener los niveles quirúrgicos de anestesia. Para mantener la temperatura corporal se emplearon cojines homeotérmicos (Braintree Scientific, INC).

Las respuestas hipocampales fueron registradas empleando un electrodo monopolar de acero inoxidable (diámetro 0.0005", Mediwire, Chicago, IL) que se colocó en el área CA3 del hipocampo en las siguientes coordenadas estereotáxicas: AP -2.9, ML +2.2, DV -3.0 (Paxinos y Watson, 1982). Las respuestas fueron evocadas a través de la estimulación directa del giro dentado, empleando un electrodo bipolar de acero inoxidable (diámetro 0.0005", Mediwire, Chicago, IL), que se colocó en las coordenadas estereotáxicas correspondientes (AP -3.5, ML -2.0, DV -3.1; (Paxinos y Watson, 1982) (Fig. 11). La estimulación (pulsos monofásicos de 20-40 μ A y 0.1 -0.25 mseg de duración) se suministró por un estimulador Grass S48 y una unidad de aislamiento fotoeléctrica. La intensidad de corriente que evocó una respuesta máxima al 50% fue usada para el registro de toda la estimulación, incluyendo la inducción de LTP. Las respuestas evocadas fueron amplificadas utilizando un amplificador Grass P5, la señal se digitalizó para almacenamiento y análisis en una computadora que cuenta con el software Brain Wave (Datawave Co.).

La LTP se indujo mediante la liberación de 3 trenes de 1 seg. de duración y 100 Hz de frecuencia con intervalos intertrén de 20 seg. Las respuestas evocadas fueron registradas durante una hora tras la estimulación

tetánica; la LTP se analizó por medio de la medición de la amplitud y la pendiente (ver figura 12) de los potenciales postsinápticos excitatorios de campo. Durante los experimentos se mantuvo un monitoreo constante del EEG, a fin de observar parámetros fisiológicos (como la presencia de ritmo theta) y detectar si existía la presencia de actividad epiléptica. Se registró una línea base de 20 minutos y posterior a la inducción tetanizante se siguió un registro de una hora.



5.3. Técnica histoquímica de Timm

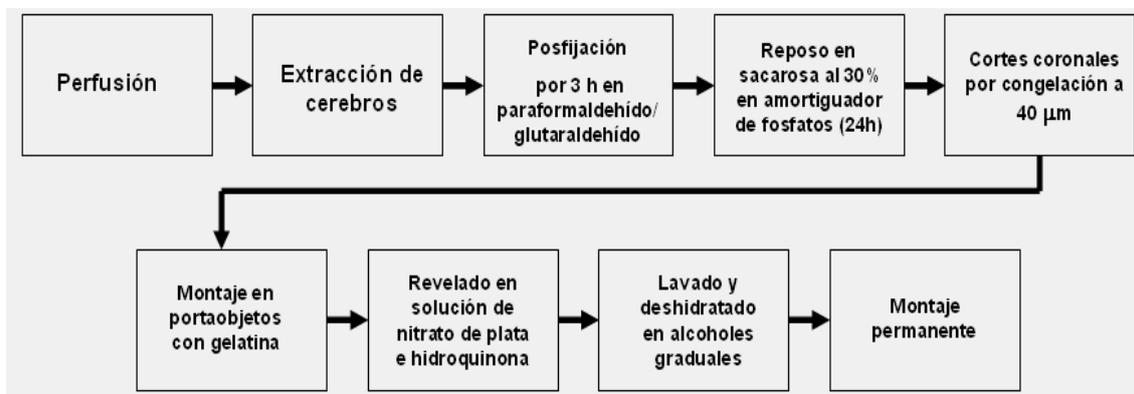
La técnica histoquímica de Timm para la detección de metales pesados, consiste en la reducción de metales pesados libres con sulfuro de sodio, cuyo producto se combina posteriormente con una sal de plata (nitrato de plata) y se somete a un proceso de revelado análogo al fotográfico, lo que conduce a la formación de plata metálica que puede ser visualizada (Danscher, 1981).

Los animales fueron perfundidos transcárdialmente con 500 ml de una solución acuosa de sulfuro de sodio al 0.4%, seguida de 500 ml de una solución de paraformaldehído al 1% y glutaraldehído al 1.25%. Posteriormente se extrajeron los cerebros y se colocaron en una solución fijadora conteniendo 30% de sacarosa. Las perfusiones fueron llevadas a cabo en distintas ventanas de tiempo después de los procedimientos electrofisiológicos; con el fin de

caracterizar el curso temporal de la sinaptogénesis hipocampal se emplearon los tiempos de tres, siete, quince, treinta, sesenta y noventa días Cabe señalar que estos tiempos se adecuaron en base a las observaciones experimentales a lo largo del presente estudio y a lo reportado en la literatura conveniente a esta investigación.

Tras dos días de efectuada la perfusión los cerebros se cortaron por congelación en secciones coronales de 40 μm , los cortes se montaron en portaobjetos cubiertos con gelatina y se tiñeron mediante la técnica histoquímica de Timm que fue llevada a cabo en oscuridad en una mezcla 12:6:2 de goma arábica (20%), hidroquinona (5.6%), buffer de citratos y 1.5 ml de una solución al 17% de nitrato de plata. Los cortes se examinaron por microscopía de luz con el fin de evaluar la presencia y distribución de los gránulos de Timm, que a su vez revelan la distribución de los botones sinápticos.

Diagrama de flujo de la técnica histoquímica de Timm.



5.4. Diseño experimental.

Los animales fueron divididos en los siguientes grupos experimentales:

- Grupo Control intacto (CON, n=5): éste grupo no fue sometido a ningún procedimiento quirúrgico o electrofisiológico; sin embargo, sus cerebros fueron analizados de acuerdo a la técnica histoquímica de Timm. Dicho grupo fue empleado a fin de establecer un parámetro neuroanatómico de las posibles modificaciones sinápticas.
- Grupo Sham (SH, n=5): al cual se le sometió a un registro electrofisiológico durante 80 minutos, en los cuales se proporcionó a los animales una estimulación de baja frecuencia (0.05Hz), manteniendo un

monitoreo constante del EEG. Al cabo de un periodo post-quirúrgico de 7 días los cerebros de éste grupo fueron analizados de acuerdo a la técnica histoquímica de Timm con el propósito de observar modificaciones sinápticas.

- Grupos LTP: los cuales fueron sometidos a un registro electrofisiológico, que consta del establecimiento de una línea base de 20 minutos (dando una estimulación de baja frecuencia a 0.05Hz), seguido de la aplicación de tres trenes de (100Hz/1 seg.) y un registro post-estimulación de una hora (regresando a la estimulación de baja frecuencia), (Escobar et al., 1997), durante el registro se mantuvo un monitoreo constante del EEG. Al cabo de un periodo post-estimulación de 3 (3D, n=5), 7 (7D, n=5), 15 (15D, n=5), 30 (30D, n=5) 60 (60D, n=5) y 90 días (90D, n=5), los animales fueron perfundidos para extraer posteriormente sus cerebros, que fueron analizados de acuerdo a la técnica histoquímica de Timm con el propósito de observar modificaciones sinápticas.

Diagrama de flujo del procedimiento electrofisiológico.



6. RESULTADOS

6.1. Resultados electrofisiológicos.

Las respuestas evocadas en el área CA3 fueron medidas a través de la obtención de los potenciales post-sinápticos excitatorios (EPSP). Las respuestas características de esta señal, las cuales fueron inducidas por pulsos monofásicos de 20 a 40 μA y 0.25 ms de duración iniciaron entre 1 a 2 ms post-estimulación y presentan su valle hacia los 5 ms. La amplitud promedio de los potenciales post-sinápticos excitatorios (PPSEs) fue de 0.43 ± 0.01 mV con una pendiente de 0.13 ± 0.01 (Fig. 12).

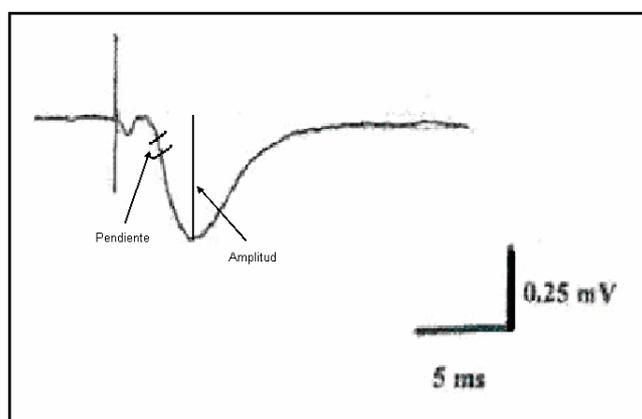


Figura 12. Esquema que muestra las características de la señal registrada.

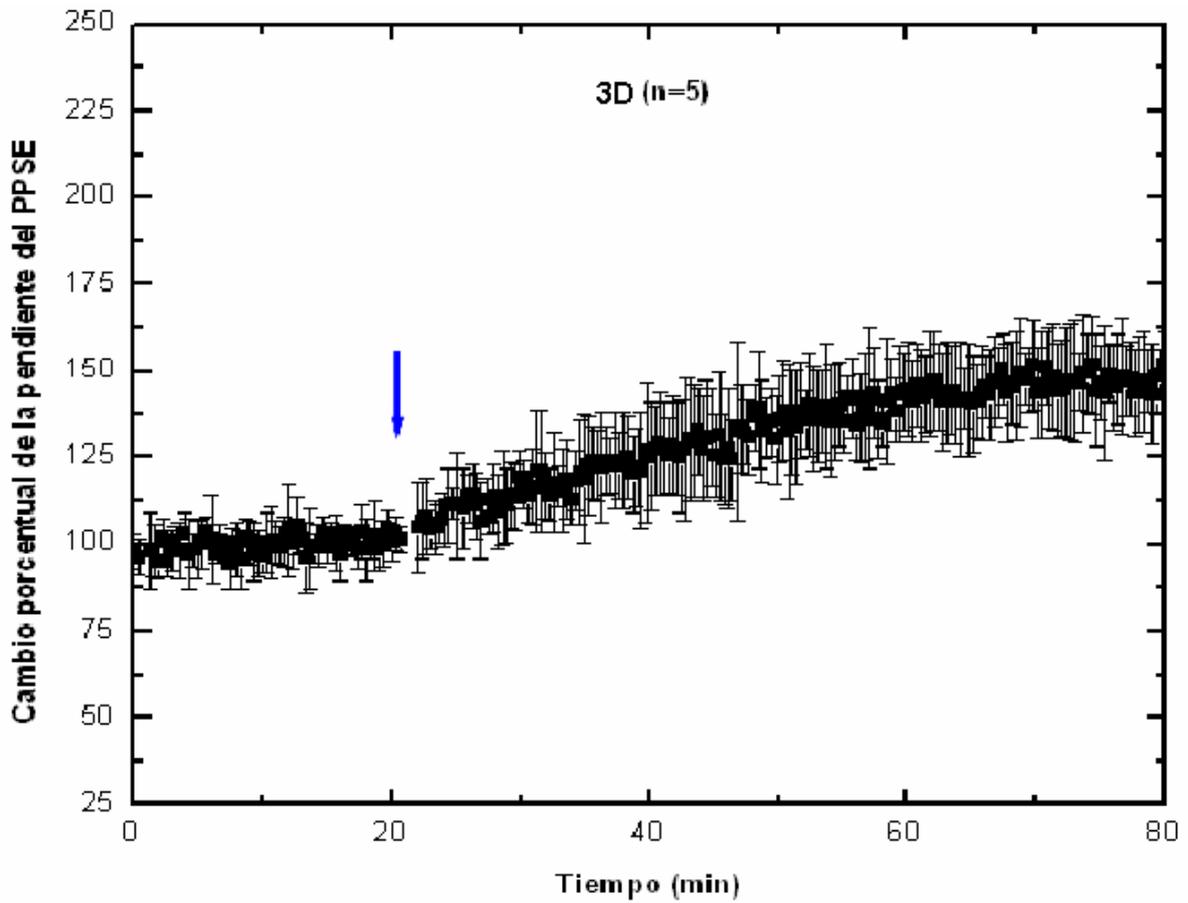
La LTP obtenida se caracterizó por un incremento inicial lento, tanto en la pendiente como en la amplitud de los PPSEs de campo, los resultados se muestran en la tabla 1. Los sujetos que fueron sometidos a las condiciones quirúrgicas y electrofisiológicas sin presentar un incremento en la respuesta de los PPSEs mayor al 20% requerido para considerar la presencia del fenómeno de la LTP, fueron descartados de la presente investigación.

GRUPO	CAMBIO PORCENTUAL	GRÁFICA
3D	141.64 ± 0.36 **	Gráfica 1
7D	140.98 ± 0.85 **	Gráfica 2
15D	138.22 ± 1.07 **	Gráfica 3
30D	144.31 ± 0.76 **	Gráfica 4

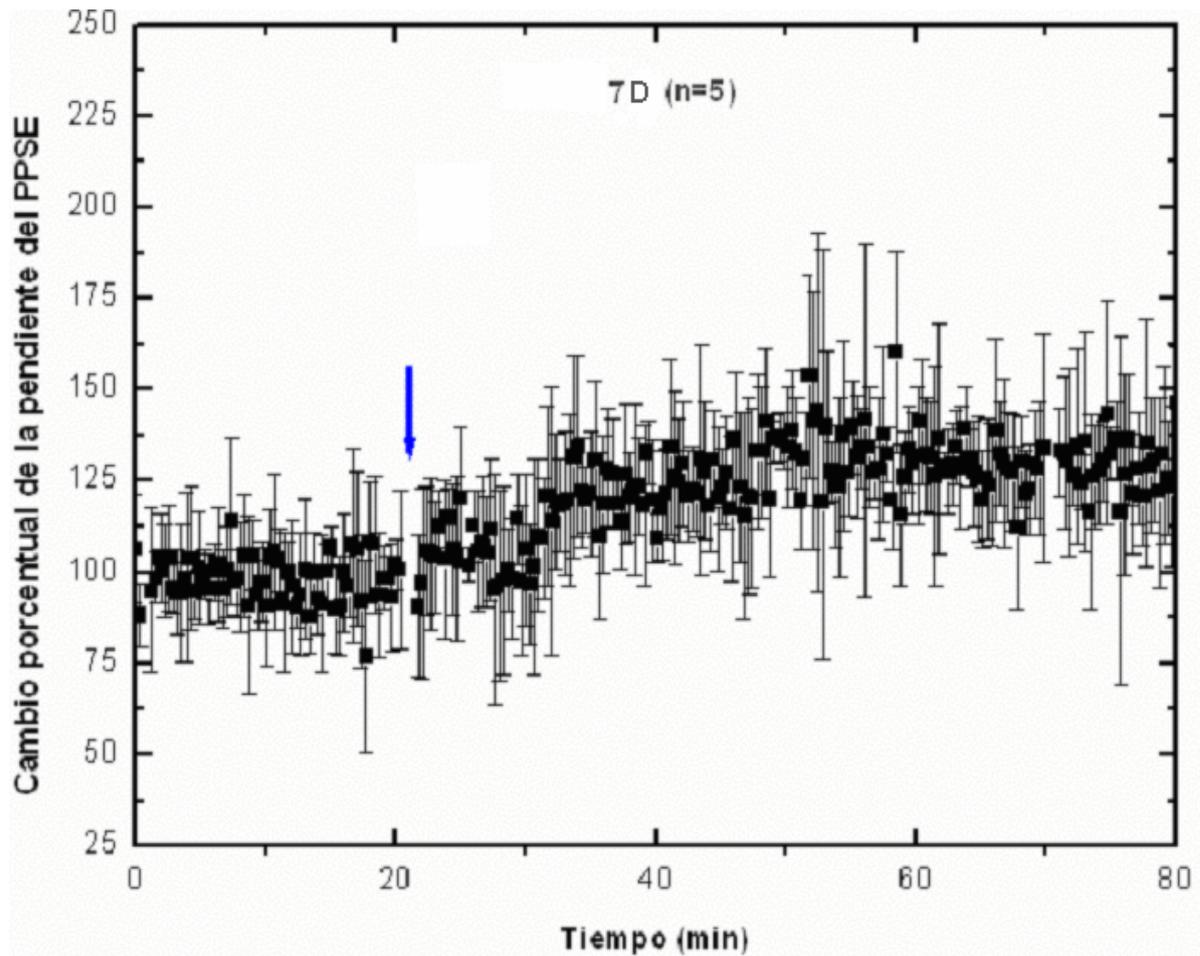
60D	142.58±0.53 **	Gráfica 5
90D	148.34±0.96 **	Gráfica 6
TOTAL	141.98±0.43 **	Gráfica 7
SH	101.90±0.46	Gráfica 8

Tabla 1. Cambio porcentual de la pendiente del PPSE respecto a la línea base de registro, ** $p < 0.01$.

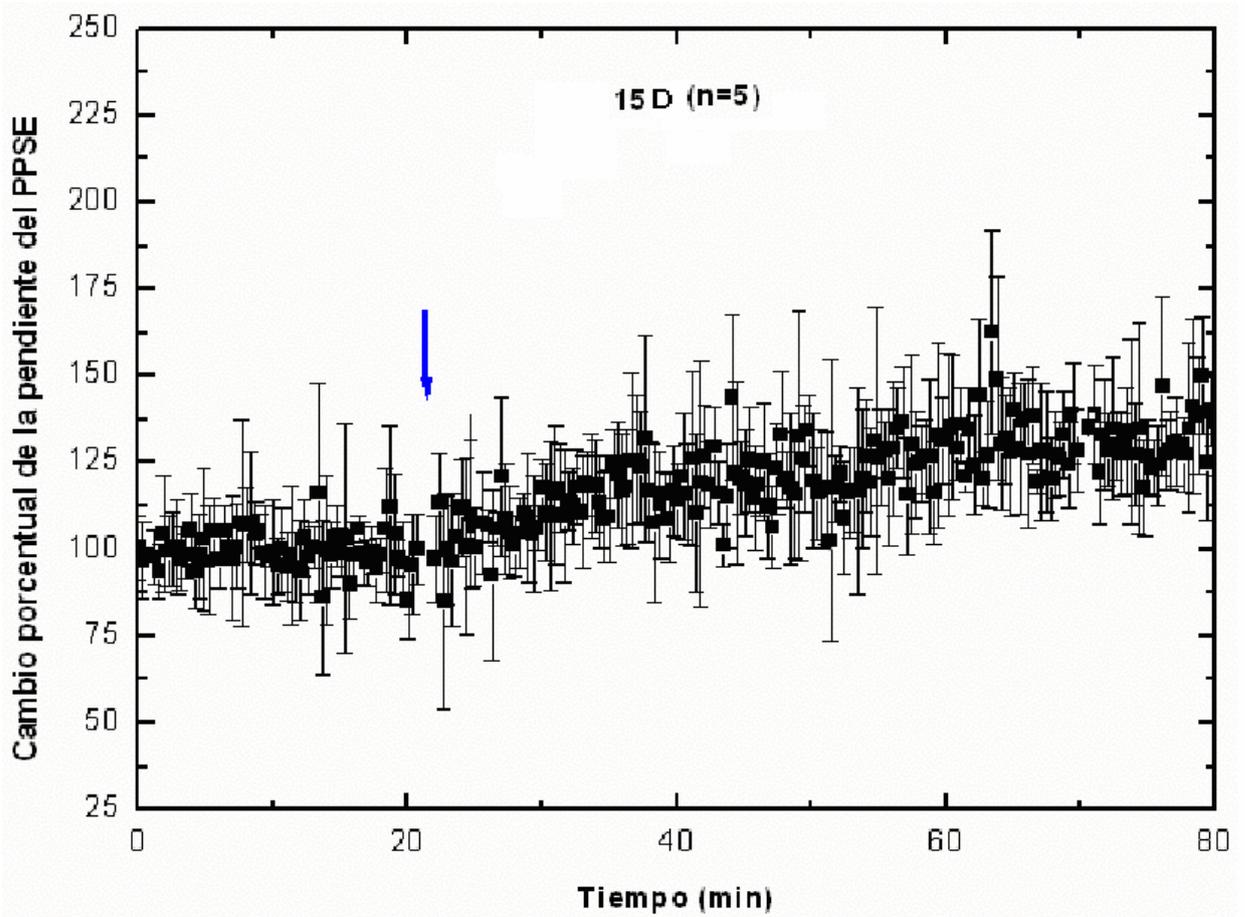
Posteriormente se aplicó un ANOVA de repetidas medidas entre los grupos a los que se sometió a la estimulación de alta frecuencia, capaz de inducir. La prueba post-hoc de Fisher no mostró diferencias significativas entre ellos. Sin embargo, la comparación entre los grupos que presentaron LTP con el grupo SH, se encontraron diferencias estadísticas significativas ($F_{(6,27)} = 4.32$, $p < 0.01$).



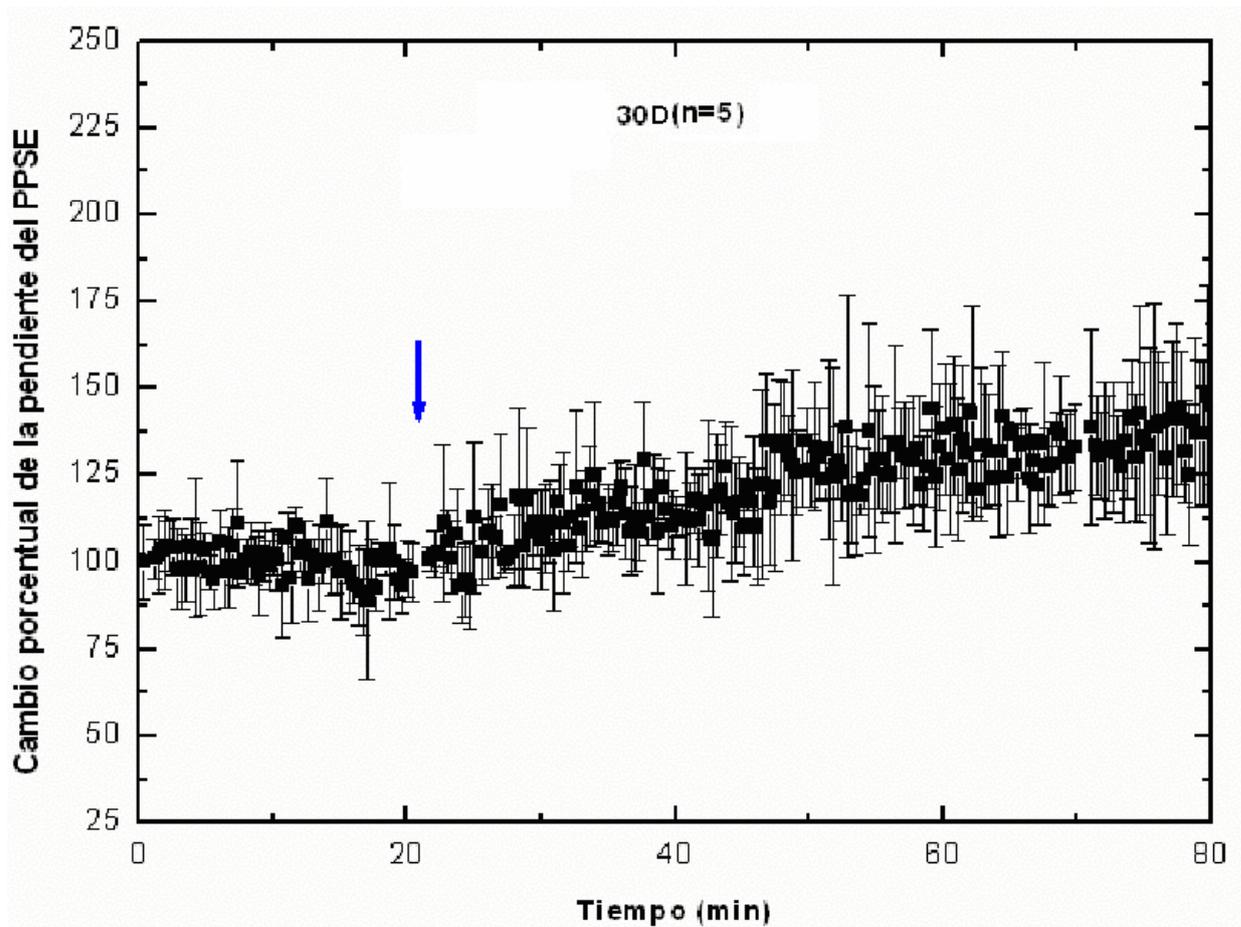
Gráfica 1. Registros *in vivo* en la vía que va del giro dentado al área CA3 hipocampal del grupo 3D. Se observa la pendiente de los PPSEs durante los 20 min. de la línea base, seguidos por la presencia del fenómeno de la LTP, (posterior a la estimulación de alta frecuencia), el cual se caracterizó por un incremento inicial lento en la pendiente logrando un incremento promedio de 141.64 ± 0.36 ↓ Indica el momento de la aplicación de los trenes de estimulación tetánica.



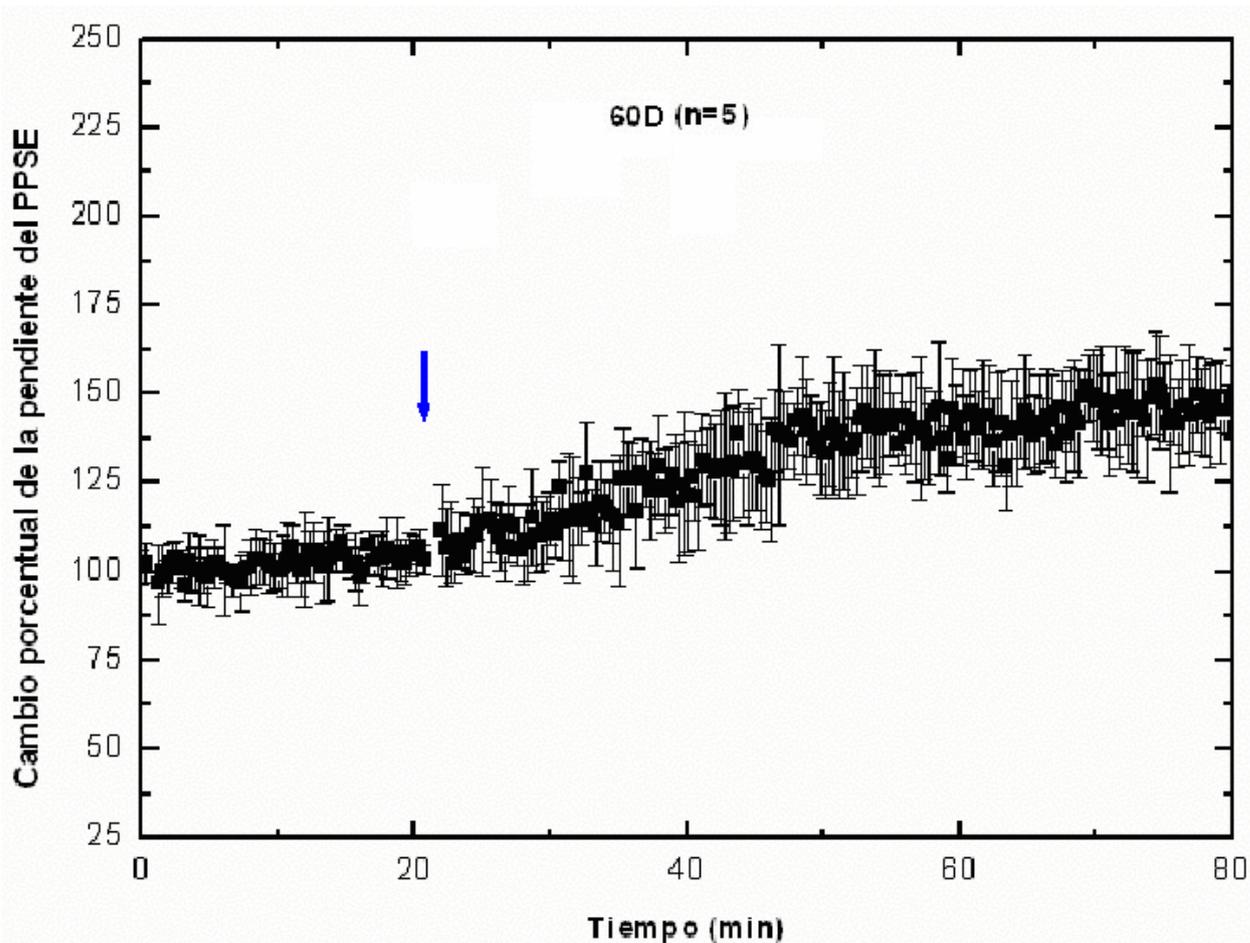
Gráfica 2. Registros *in vivo* en la vía que va del giro dentado al área CA3 hipocámpal del grupo 7D. Se observa la pendiente de los PPSEs durante los 20 min. de la línea base, seguidos por la presencia del fenómeno de la LTP, (posterior a la estimulación de alta frecuencia), el cual se caracterizó por un incremento inicial lento en la pendiente logrando un incremento promedio de 140.98 ± 0.85 . ↓ Indica el momento de la aplicación de los trenes de estimulación tetánica.



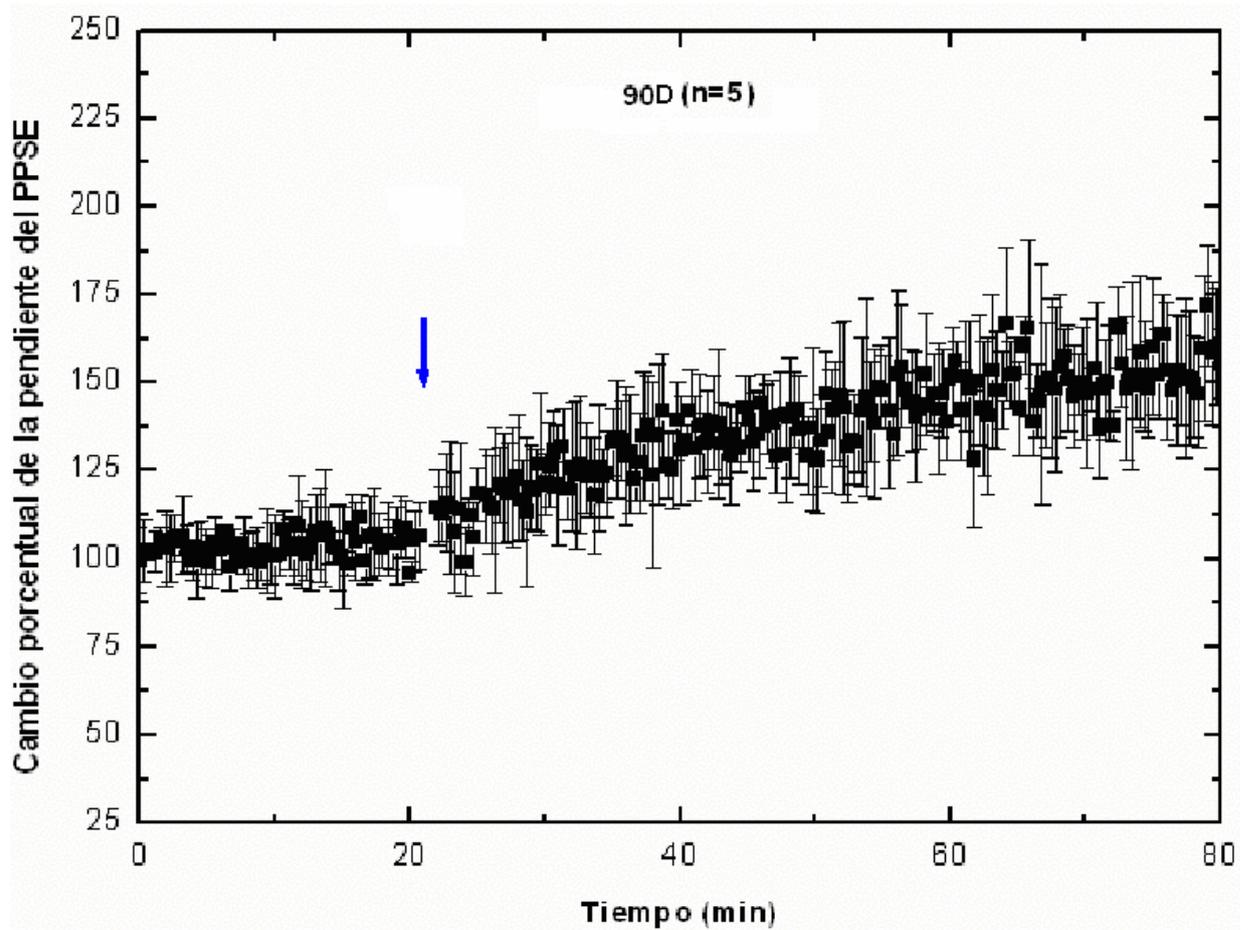
Gráfica 3. Registros *in vivo* en la vía que va del giro dentado al área CA3 hipocampal del grupo 15D. Se observa la pendiente de los PPSEs durante los 20 min. de la línea base, seguidos por la presencia del fenómeno de la LTP, (posterior a la estimulación de alta frecuencia), el cual se caracterizó por un incremento inicial lento en la pendiente logrando un incremento promedio de 138.22 ± 1.07 .  Indica el momento de la aplicación de los trenes de estimulación tetánica.



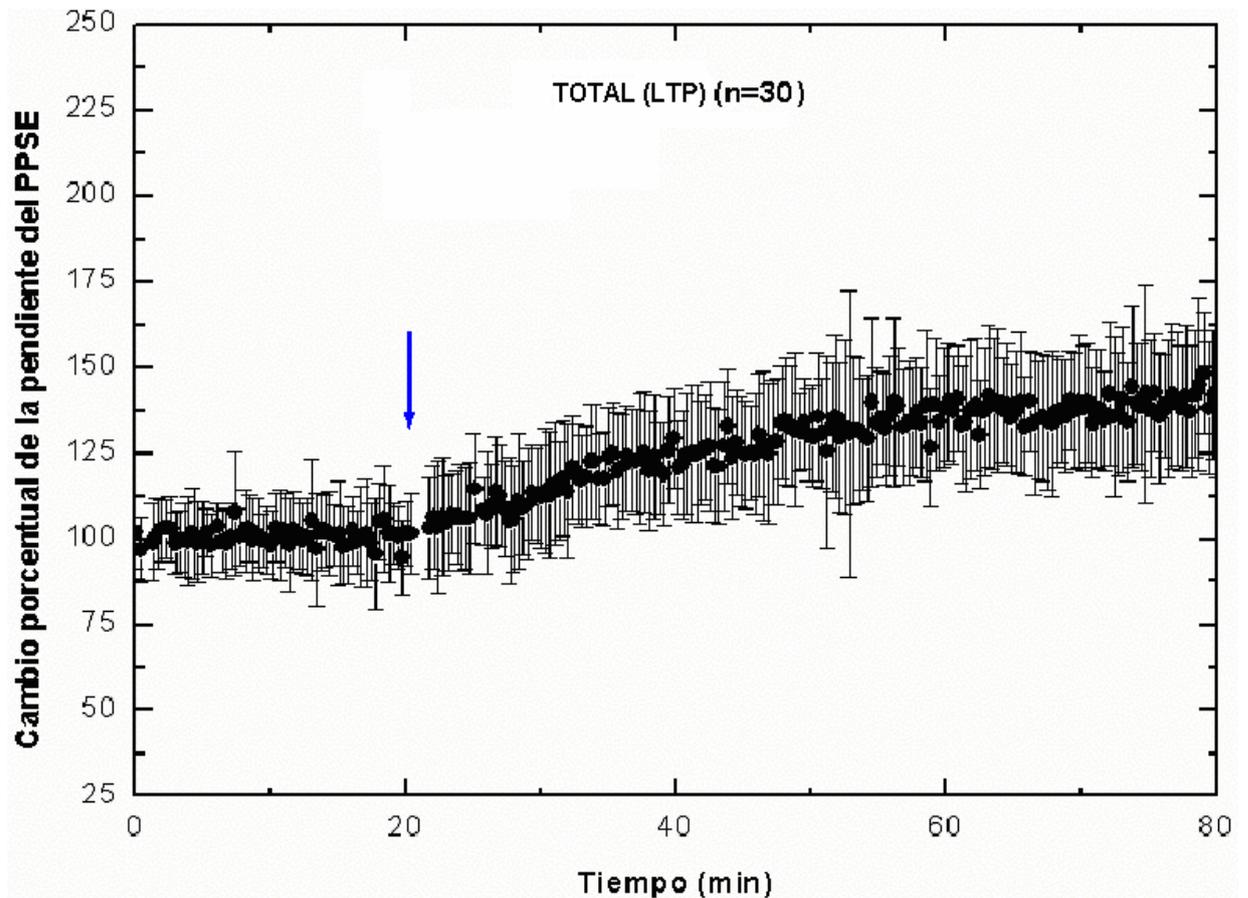
Gráfica 4. Registros in vivo en la vía que va del giro dentado al área CA3 hipocampal del grupo 30D. Se observa la pendiente de los PPSEs durante los 20 min. de la línea base, seguidos por la presencia del fenómeno de la LTP, (posterior a la estimulación de alta frecuencia), el cual se caracterizó por un incremento inicial lento en la pendiente logrando un incremento promedio de 144.31 ± 0.76 .  Indica el momento de la aplicación de los trenes de estimulación tetánica.



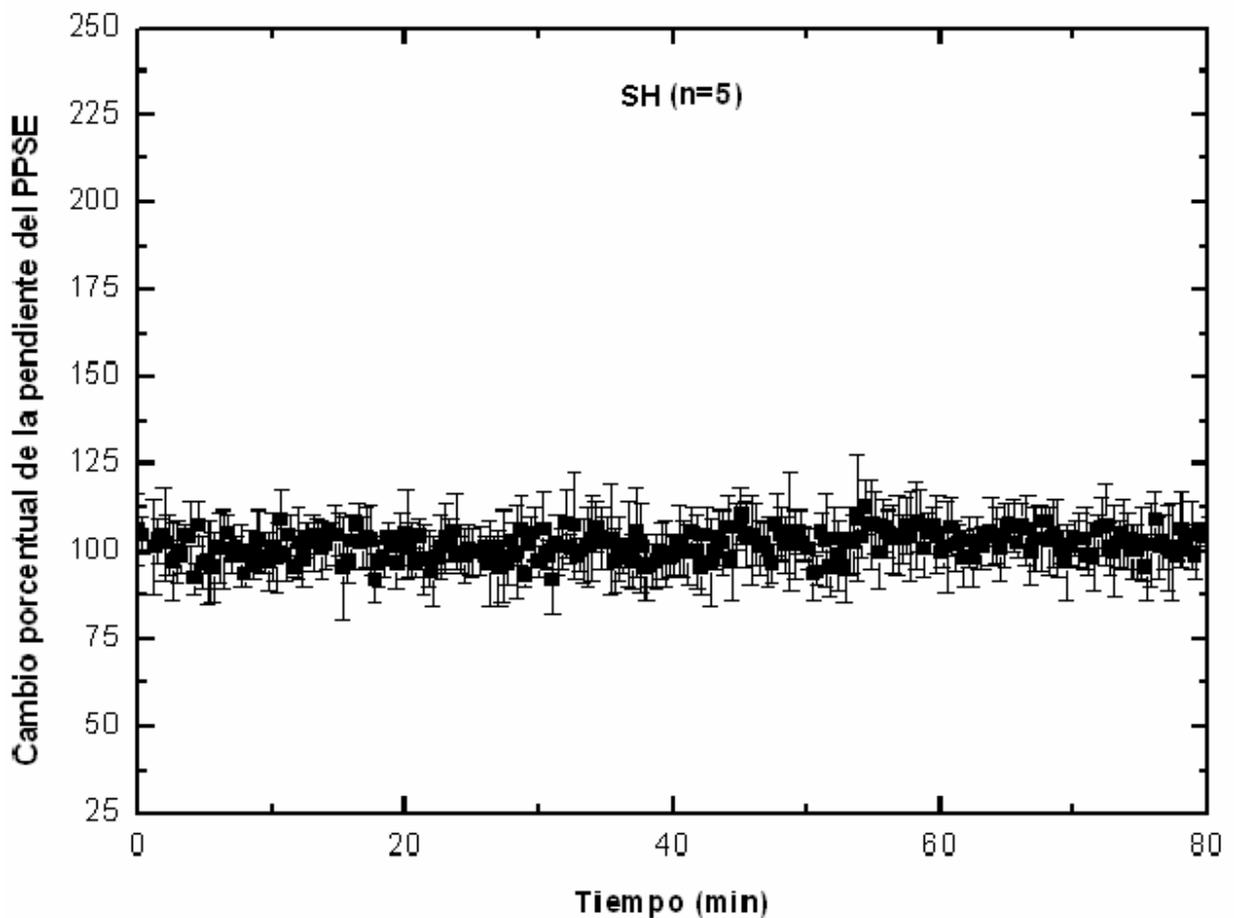
Gráfica 5. Registros *in vivo* en la vía que va del giro dentado al área CA3 hipocampal del grupo 60D. Se observa la pendiente de los PPSEs durante los 20 min. de la línea base, seguidos por la presencia del fenómeno de la LTP, (posterior a la estimulación de alta frecuencia), el cual se caracterizó por un incremento inicial lento en la pendiente logrando un incremento promedio de 142.58 ± 0.53 .  Indica el momento de la aplicación de los trenes de estimulación tetánica.



Gráfica 6. Registros in vivo en la vía que va del giro dentado al área CA3 hipocampal del grupo 90D. Se observa la pendiente de los PPSEs durante los 20 min. de la línea base, seguidos por la presencia del fenómeno de la LTP, (posterior a la estimulación de alta frecuencia), el cual se caracterizó por un incremento inicial lento en la pendiente logrando un incremento promedio de 148.34 ± 0.96 . ↓ Indica el momento de la aplicación de los trenes de estimulación tetánica.



Gráfica 7. Registros *in vivo* en la vía que va del giro dentado al área CA3 hipocampal total de todos los grupos a los que se indujo LTP. Se observa la pendiente de los PPSEs durante los 20 min. de la línea base, seguidos por la presencia del fenómeno de la LTP, (posterior a la estimulación de alta frecuencia), el cual se caracterizó por un incremento inicial lento en la pendiente logrando un incremento promedio de 141.98 ± 0.43 . ↓ Indica el momento de la aplicación de los trenes de estimulación tetánica.



Gráfica 8. Registros *in vivo* en la vía que va del giro dentado al área CA3 hipocampal del grupo SH. Se observa la pendiente de los PPSEs durante los 80 min. de registro en ausencia de estimulación de alta frecuencia capaz de inducir el fenómeno de la LTP. El promedio de la pendiente se mantuvo constante con un porcentaje de 101.90 ± 0.46 .

6.2. Resultados histoquímicos.

Los resultados histoquímicos de la presente investigación, muestran que siete días después de la estimulación tetánica (en ausencia de actividad electroconvulsiva), se indujo una reorganización sináptica de la región infrapiramidal del estrato oriens en el área CA3 hipocampal en comparación

con el grupo SH, 3D (figura 13) y el grupo CON. Esta reorganización fue preponderantemente contralateral (figura 14 E y Gráfica 9). Sin embargo, dicha reorganización modifica su patrón, haciéndolo de apariencia bilateral a los 15 días posteriores a la inducción de LTP, tal patrón mantiene esta bilateralidad por lo menos 75 días más (figura14 G-N y Gráfica 9).

El procesamiento de los tejidos por la técnica histoquímica de Timm para metales pesados permitió observar claramente al microscopio de luz la formación de gránulos de plata metálica (reacción positiva) en la zona correspondiente al campo terminal de las fibras musgosas. Esta zona se logró apreciar como una banda curva que nacía en el límite del hilus del hipocampo y el giro dentado, concentrándose después en la zona inmediata de las células piramidales del área CA3, llegando hasta el límite del área CA1.

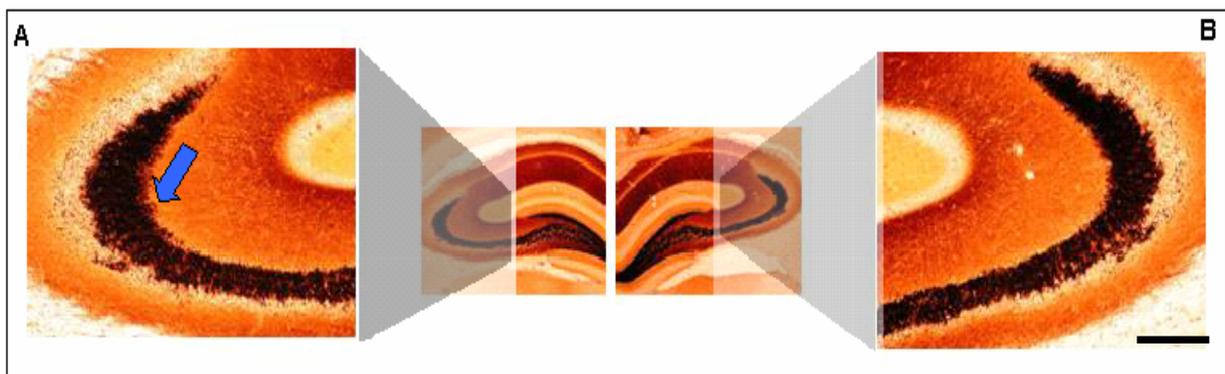
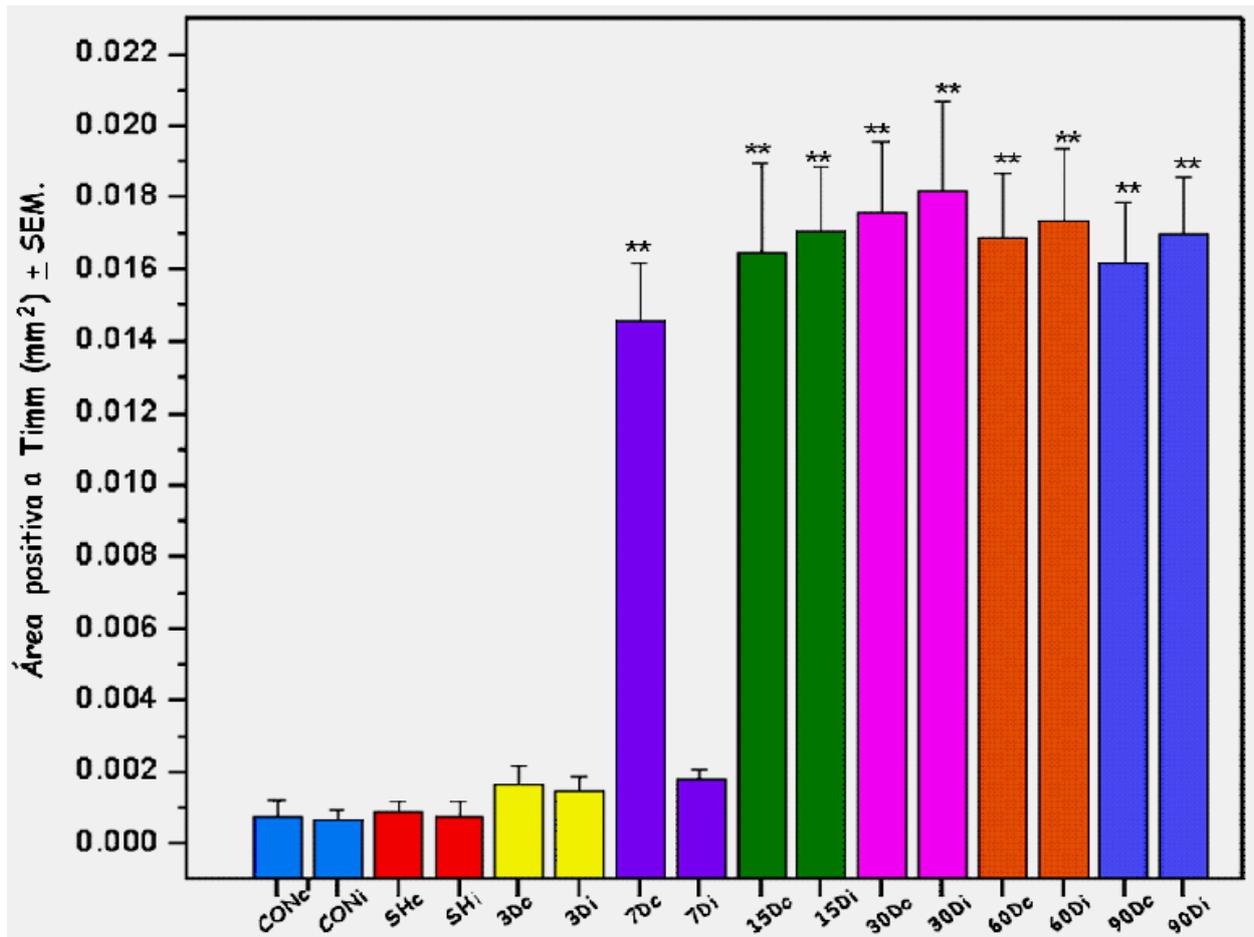


Figura 13. Secciones coronales de los hipocampos dorsales procesados por la técnica histoquímica de Timm provenientes del grupo 3D. A y B corresponden al lado contralateral e ipsilateral a la estimulación respectivamente. La flecha indica la detección de gránulos de la plata metálica en la zona correspondiente al campo terminal de las fibras musgosas. La escala de la barra corresponde a 0.1 mm.



Figura 14. Secciones coronales de los hipocampos dorsales procesados por la técnica histoquímica de Timm provenientes de los siguientes grupos; A y B: CON; C y D: SH; E y F: 7D; G y H: 15D; I y J: 30D; K y L 60D y M y N: 90D. C, E, G, I, K, M, corresponden a los cortes contralaterales a la estimulación; D, F, H, J, L y N, corresponden al lado ipsilateral a la estimulación.  : Indica la detección de gránulos de la plata metálica en la zona correspondiente al campo terminal de las fibras musgosas  muestran la presencia de gránulos de plata en la zona infrapiramidal del estrato oriens. La escala de la barra corresponde a 0.1 mm.

Esta *nueva banda* fue digitalizada y capturada por una cámara (Nikon COOLPIX 5000) conectada a un microscopio óptico (Nikon Eclipse E600), posteriormente las imágenes tomadas fueron ecualizadas, es decir se aplicaron los mismos parámetros de contraste y brillo mediante el programa Adobe Photoshop 5.0 y analizadas con el software Scion Image; Scion Corporation, Frederick, MD. Los gránulos marcados positivamente en el estrato oriens, fueron comparados en relación a la magnitud de gránulos marcados en el estrato lúcido de cada imagen. Se tomaron 4 muestras de cada sujeto en una región dorsal del hipocampo, tal como lo reportaron Ramírez-Amaya y colaboradores en 2001. Una vez obtenidas las medidas del área marcada positivamente a la técnica de Timm (mm^2), se procedió a realizar una prueba post-hoc de Fisher, la cuál muestra diferencias significativas entre los grupos 15D, 30D, 60D y 90 D en comparación con los grupos: CON, SH, 3D y 7D en el lado ipsilateral (el lado de la estimulación) ($F_{(7,24)} = 6.15, p < 0.01$); mientras que en el lado contralateral se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los grupos: 7D, 15D, 30D, 60D y 90D en comparación con los grupos: CON, SH y 3D, ($F_{(7,24)} = 5.48, p < 0.01$); (Gráfica 9).



Gráfica 9. Análisis densitométrico de la sinaptogénesis observada en el estrato oriens del área CA3. La gráfica muestra el área positiva a Timm (mm²) ± SEM. c o i indican el promedio de los lados contralateral e ipsilateral, respectivamente. Notar que el patrón de reorganización observado a los 7 días posteriores a la estimulación de alta frecuencia sufre una modificación a lo largo del tiempo, presentando una apariencia bilateral, la cual persiste por lo menos 75 días más. **p<0.01.

7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

En las últimas décadas dos campos científicos distintos han tenido un auge importante: el de la neurobiología y el de la psicología cognitiva. Recientemente, estos dos campos se han preocupado por trabajar de manera interdisciplinaria, para buscar los substratos biológicos de procesos como la

percepción, el lenguaje, el pensamiento, la memoria y la conciencia. Dentro de estos, las investigaciones sobre el aprendizaje y la memoria han tenido importantes avances. Esto nos da la oportunidad de ir adentrándonos en el análisis de los mecanismos moleculares de los procesos mentales.

El aprendizaje es el proceso por medio del cual adquirimos información del medio que nos rodea; la memoria es el proceso a través del cual recordamos lo que hemos aprendido. De hecho el aprendizaje y la memoria trascienden al individuo hacia la transmisión de la cultura de generación en generación. Estos procesos son el vehículo por el cual nos adaptamos y por tanto, son esenciales para el progreso social. La pérdida de estos procesos traería consecuencias avasalladoras en nuestra vida, ya que, significaría la pérdida de contacto con nuestro "yo", con nuestra historia y con los seres humanos con los que interactuamos; debido a lo anterior, estos procesos son primordiales para nuestro sentido de individualidad (Kandel, 1992).

A finales del siglo XIX, el neurocientífico español Santiago Ramón y Cajal propuso que el sustrato físico de la memoria podría residir en las modificaciones más o menos perdurables en la fortaleza de la transmisión sináptica. Dicha idea fue retomada por brillantes neurólogos como Hebb, Eccles y Lorente de No, quienes formalizaron las bases teóricas que dirigen el estudio de los procesos celulares subyacentes al aprendizaje y la memoria. Actualmente, gracias a las evidencias científicas, sabemos que el cerebro se modifica a consecuencia de la actividad a la que es sometido, lo cual se ha vuelto primordial para explicar cómo se da el almacenamiento de información en los organismos. Tanto los mecanismos que subyacen al incremento de la eficiencia sináptica como las modificaciones estructurales tienen una especial relevancia para el estudio de los procesos de aprendizaje y memoria, fundamentalmente debido a que representan expresiones de plasticidad sináptica de larga duración.

Potenciación a Largo Plazo en las fibras musgosas.

En la presente investigación, se encontró que la estimulación de alta frecuencia fue capaz de generar LTP en la vía de las fibras musgosas en el hipocampo, con características similares a la que se han reportado en estudios previos llevados a cabo en esta misma vía (Derrick et al, 1991; Nicoll y

Malenka, 1995; Adams et al., 1997, Escobar et al., 1997). Se ha descrito que la LTP en esta vía es caracterizada por un lento incremento tanto en la pendiente como en la amplitud de los PPSEs y que es dependiente de los receptores a péptidos opioides, ya que cuando se aplican inhibidores de éstos, la LTP de las fibras musgosas es inhibida, además se conoce que existe una alta presencia de este tipo de receptores, en los botones terminales de éstas fibras (Derrick et al, 1991 Escobar et al., 1997).

Plasticidad sináptica en la etapa adulta: reorganización sináptica en las fibras musgosas.

Si bien no existe duda de que los organismos pueden aprender nuevas habilidades y establecer nuevas memorias en el transcurso de su vida los mecanismos del aprendizaje, así como de otros cambios plásticos siguen siendo no del todo conocidos. Cada vez existe mayor evidencia de que estos fenómenos se basan en cambios regulados por la fuerza de las sinapsis durante las etapas tempranas del desarrollo; en los adultos, los cambios se dan principalmente en las conexiones entre neurona y neurona. Asimismo sabemos que los cambios plásticos en la etapa adulta son similares a los que ocurren durante el desarrollo con una tasa de incidencia relativamente menor (Monville, 2001; Seri et al., 2001).

La plasticidad sináptica puede ser modificada para dar lugar a la adaptación de los individuos a su medio ambiente y tales cambios se ven reflejados desde un lapso de milisegundos hasta años. Los mecanismos celulares que subyacen van desde cambios transitorios de la neurotransmisión hasta alteraciones más pronunciadas, es decir, cambios en la expresión genética que tienen como consecuencia cambios estructurales (Lamprecht y LeDoux J. 2004).

Los cambios que suceden como consecuencia de procesos relacionados con el aprendizaje y la memoria se han observado en dos modalidades principalmente: cambios en sinapsis previamente existentes y cambios en el número de sinapsis. Los primeros se refieren principalmente a la potenciación de la eficiencia de las sinapsis, los cuales incluyen, reorganización de las zonas activas, especialización de los contactos sinápticos (como cantidad de vesículas que liberan el neurotransmisor), cambios en la geometría de los

componentes pre y postsinápticos y la extensión y la continuidad de especialización postsináptica. Aunque los cambios en la morfología de las zonas activas ocurren frecuentemente se cree, que un substrato probable de la memoria de largo plazo, podrían ser los cambios en el número o patrón de las conexiones sinápticas (Vicario-Abejón, et al., 2002).

En la presente investigación, la estimulación tetánica capaz de inducir potenciación a largo plazo, dio lugar a una reorganización sináptica en la región infrapiramidal del estrato oriens en el área CA3 hipocampal *siete días* después de la estimulación en ausencia de actividad epiléptica. Dicha reorganización se pudo observar y analizar gracias a la aplicación de la técnica histoquímica de Timm, que nos permite observar la formación de gránulos de plata metálica en los tejidos, células o partes de ellas en donde existen metales pesados libres como el zinc; los botones de las fibras musgosas contienen altas concentraciones de éste metal, por lo que su observación resulta accesible ante la reacción de la técnica de Timm. El tipo de reorganización sináptica encontrada en el presente estudio, mostró características histológicas similares a las descritas por Represa y Ben-Ari (1992), Escobar et al. (1997) y Adams et al. (1997), en animales donde se aplicó estimulación de alta frecuencia que indujo LTP en las fibras musgosas. La reorganización en el área CA3 hipocampal también ha sido reportada en humanos que padecían epilepsia (De Lanerole et al., 1989). Las sinapsis observadas en este tipo de reorganización fueron denominadas como ectópicas o aberrantes por Ben-Ari y Represa (1990), ya que, se sabe que hay una ausencia casi total de estas sinapsis en el estrato oriens de ratas intactas de la cepa Wistar en los niveles septo-temporales que han sido explorados con la técnica de Timm, lo que es confirmado en el presente trabajo por los resultados obtenidos en los grupos CON y SH.

Se ha propuesto que las nuevas sinapsis se forman a partir de las colaterales axónicas de las fibras musgosas ya existentes que cruzan el estrato piramidal y que hacen contacto con las dendritas apicales, para hacer contacto con la región basal de las células piramidales del área CA3 (Fig. 15). La presencia de botones musgosos morfológicamente normales en el estrato oriens, permite suponer, que la funcionalidad de estas sinapsis es también normal. Aún cuando las propiedades funcionales de esta reorganización, no

están del todo comprendidas, el incremento en la densidad sináptica de las fibras musgosas, en torno a las células piramidales del área CA3 de los animales que recibieron estimulación de alta frecuencia, sugiere que el incremento en la superficie de contacto sináptico, podría traducirse en un aumento en la eficiencia sináptica de la región involucrada (Bailey y Kandel, 1993). Estudios realizados con animales sometidos a tareas de aprendizaje (Ramírez-Amaya et al., 1999 y 2001; Genisman, 2000), revelan también la presencia de modificaciones sinápticas similares a las reportadas con fenómenos convulsivos o con estimulación de alta frecuencia, señalándose así, un nexo entre los procesos de aprendizaje y memoria con modificaciones estructurales.

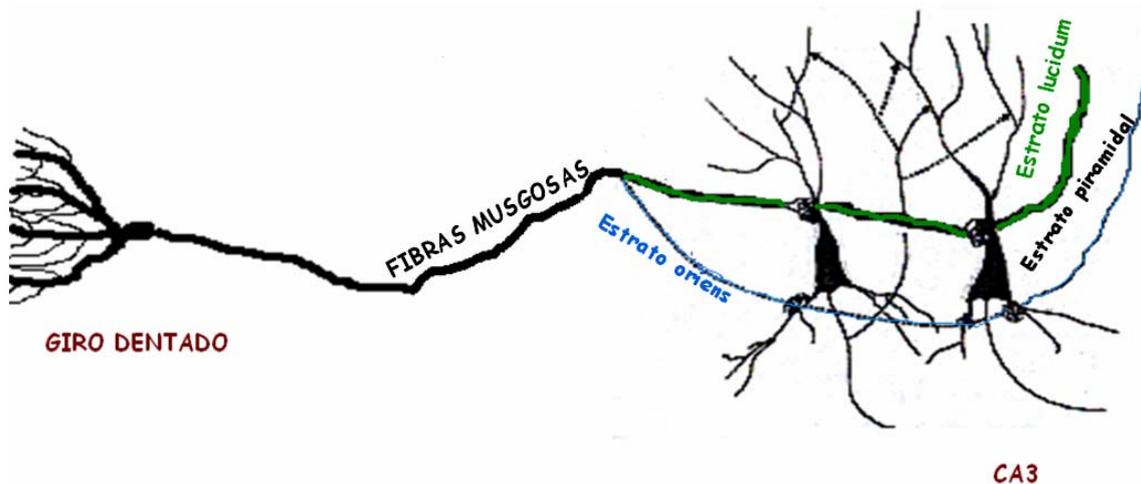


Figura 15. Representación esquemática, en la que se muestran los cambios propuestos (marcados en azul), que generan los axones colaterales de las fibras musgosas en el estrato oriens en el área CA3 hipocámpal (modificado de Ben-Ari y Represa, 1990).

Se ha observado, en experimentos realizados con el fenómeno de kindling (Cavazos et al., 1991; Mello et al., 1993; Wheal et al., 1998), que las terminales sinápticas de las fibras musgosas *de novo* se desarrollan a partir de aproximadamente el cuarto día post-estimulación, en concordancia con dichos estudios, los resultados del presente estudio muestran que el grupo 3D no muestra una reorganización en el estrato oriens, a pesar de haber sido sometido a la estimulación de alta frecuencia. Las nuevas sinapsis generadas en el fenómeno de kindling son susceptibles a presentar mayor excitabilidad (lo que sugiere que éstas conexiones, siguen siendo funcionales), en estos

estudios se registró la presencia de sinapsis ectópicas después de 100 días (Mello et al., 1983) e incluso 8 meses después de haber inducido kindling (Cavazos et al., 1991).

En el presente estudio, el patrón de reorganización observado a los siete días post-estimulación es bilateral, con carácter prominentemente contralateral al lado en el que la estimulación tetánica fue inducida, esto concuerda con estudios previos en los que se emplearon modelos de epilepsia experimental en donde se observó una reorganización prominentemente contralateral (Dailey et al., 1994). En concordancia con los resultados de la presente investigación, este fenómeno de reorganización se ha reportado también en estudios en los que se aplicó estimulación de alta frecuencia capaz de inducir LTP (Adams et al., 1997, Escobar et al., 1997). Sin embargo, en el presente trabajo podemos ver que el patrón presenta modificaciones conforme se incrementa el tiempo entre el procedimiento electrofisiológico y el análisis histológico, observándose a los quince días post-estimulación una reorganización bilateral, la cual permanece, al menos, setenta y cinco días más lo cual enfatiza el carácter dinámico de la reorganización sináptica observada.

La reorganización prominentemente contralateral observada en el presente estudio ha sido previamente reportada en modelos de epilepsia experimental y tras la estimulación de LTP unilateral (Represa et al, 1989; Ben-Ari y Represa, 1990; Cavazos et al, 1991; Sundstrom et al, 1993, Escobar et al., 1997). Este patrón prominentemente contralateral, sugiere la participación de un grupo de células localizadas en el hilus altamente excitatorias, llamadas células musgosas que envían proyecciones al hilus contralateral. A su vez, las células granulares del giro dentado reciben en un tercio interno proyecciones de las células musgosas ipsi y contralaterales (Buchmaster, 1996). Los botones gigantes de las fibras musgosas hacen sinapsis alrededor de todo el árbol dendrítico de las células musgosas con las neuronas piramidales del área CA3. Se ha propuesto que, debido a las grandes ramificaciones del árbol dendrítico de las células musgosas, las fibras musgosas hacen 5 veces más contactos sinápticos con estas células que con las neuronas piramidales del área CA3 (Frotscher et al., 1991; Buckmaster et al., 1993; Fujise Y Kosaka, 1999; Lysetskiy et al., 2005). Es posible entonces, que la estimulación de alta frecuencia aplicada en el giro dentado active de forma prominente a las células

musgosas y éstas a su vez induzcan la activación de las fibras musgosas contralaterales (Represa et al, 1987; Ben-Ari y Represa, 1990; Cavazos et al, 1991; Sundstrom et al, 1993, Bramham et al., 1996; Escobar et al., 1997), (Fig. 16).

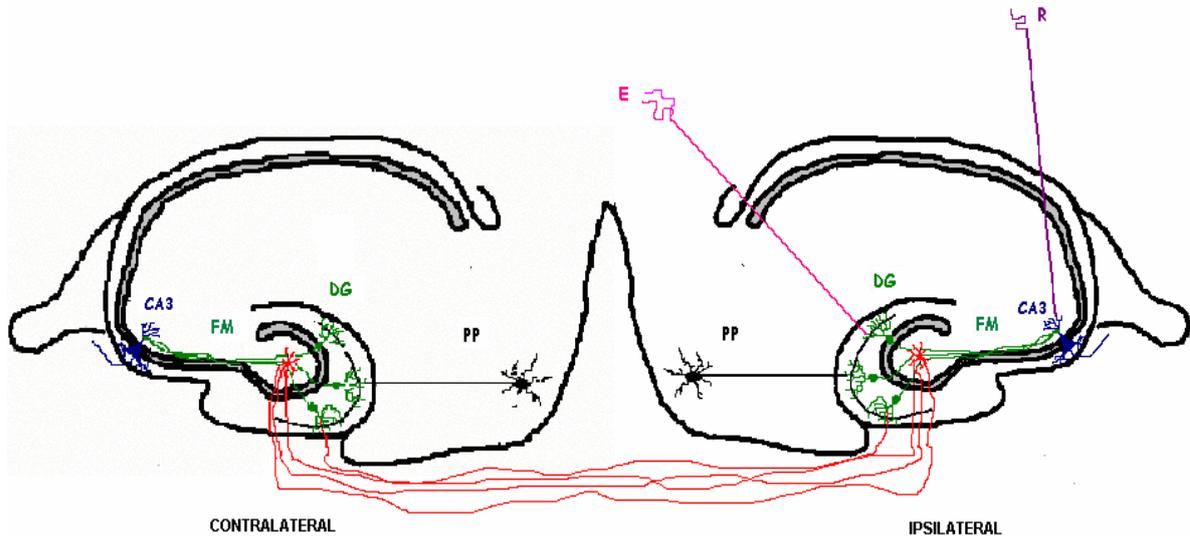


Figura 16. Representación esquemática de las células musgosas (en rojo) que reciben una gran cantidad de estimulación excitatoria proveniente de las fibras musgosas y se conectan con el hipocampo contralateral (Modificado de Bramham et al., 1996).

El curso temporal de los cambios morfológicos que se reportan en la presente investigación sugieren la formación de circuitos que se activan de forma recíproca. En el grupo 3D se observa que la reorganización sináptica en las fibras musgosas en el área infrapiramidal del estrato oriens en la región CA3 hipocámpal no se expresa aún, la reorganización es observada hacia los siete días posteriores a la inducción de la LTP en este sistema de comunicación. Sin embargo, como he señalado anteriormente, esta reorganización se modifica a través del tiempo. Es posible que la modificación del patrón de reorganización, la cual se refleja en un fortalecimiento de las conexiones que muestran un carácter bilateral, se encuentre relacionada con el paso de información del hipocampo hacia áreas corticales, en particular de la corteza prefrontal, incluyendo el cíngulo anterior y la corteza temporal (Wiltgen et al., 2004). Son numerosos los estudios que abordan la relación entre el paso de información del hipocampo a la corteza. Investigaciones realizadas en humanos en torno a la consolidación de memorias declarativas han reportado

la participación del lóbulo temporal en la formación inicial de éstas, pero una vez que la información se consolidó se sabe que dichas memorias no requieren de la participación de estructuras temporales para llevar a cabo su evocación (McClelland et al, 1995). Takehara y colaboradores (2003), mostraron que al lesionar el hipocampo en etapas posteriores a la fase temprana de un entrenamiento en ratas, se presentaba un déficit en la evocación conductual, sin embargo si se lesionaba en una fase tardía, es decir, una vez que ya había tenido lugar la consolidación, las ratas podían ejecutar adecuadamente las tareas para las que se les había entrenado. Los estudios anteriores sugieren que los cambios sinápticos en regiones corticales puede subyacer a la formación o estabilización de memorias remotas en la corteza, asimismo indican una importante interacción entre el hipocampo y áreas corticales para el almacenamiento de información, posiblemente formando un "loop" de información el cual reverbera en los circuitos formados entre el hipocampo y la neocorteza, es decir mientras la información es consolidada las conexiones sinápticas se fortalecen en dichas áreas y posteriormente dan lugar a un almacenamiento permanente de la información adquirida. Asimismo, es importante señalar que estos nuevos circuitos formados sufren modificaciones dependientes tanto de la actividad a la que se vean sometidos, como al curso temporal (Wiltgen et al., 2004).

Mecanismos moleculares que subyacen a la reorganización sináptica.

Las investigaciones que han observado modificaciones dependientes de la actividad, han originado una serie de estudios que exploran los mecanismos celulares que posibilitan la remodelación sináptica. Los avances en este terreno nos han permitido saber que las conexiones sinápticas tienen tres elementos principales: la terminal presináptica, el espacio sináptico y la terminal postsináptica. Las terminales presinápticas contienen una gran cantidad de vesículas sinápticas, que se encargan de almacenar, transportar y liberar el neurotransmisor en el espacio sináptico. Los neurotransmisores viajan en este espacio y llegan a la terminal postsináptica, la cual tiene receptores y canales iónicos que permiten el anclaje del neurotransmisor. Se calcula que el cerebro tiene alrededor de 100 mil millones de neuronas y cada una de ellas recibe y envía aproximadamente 10 mil contactos sinápticos; éstos pueden ser

excitatorios, inhibitorios y/o moduladores, es decir una neurona puede recibir contactos de varias clases en el mismo momento. Esta forma de comunicación tan compleja requiere de una organización perfectamente bien estructurada, por lo que la formación de las nuevas sinapsis necesita tener mecanismos moleculares específicos y funcionales. Hasta el momento, los estudios sobre la guía axónica nos han permitido conocer que la formación de contactos sinápticos se lleva a cabo en dos fases principales; la primera consta de la elongación del axón en búsqueda de su contacto sináptico blanco o diana; la segunda consta del establecimiento de contactos estables y funcionales hasta llegar a la diferenciación pre y post-sináptica (Yuste y Bonhoeffer, 2004). Para que esto se lleve a cabo interviene una serie de proteínas que se han visto ampliamente involucradas en tales procesos denominadas integrinas y lamininas. Estas proteínas funcionan como quimioattractores y permiten que los axones sigan un camino adecuado. Algunas otras moléculas involucradas son las moléculas de adhesión celular (CAMs) (Brose, 1999), entre las que se encuentran las caderinas, las neurexinas y las neuriliginas, que participan en el proceso de búsqueda de las células blanco, pues permiten que un grupo de axones permanezcan unidos a través de su camino, formando así una vía común. Asimismo, para que se lleve a cabo la elongación del axón es necesario que tenga lugar la polimerización de actina (proteína estructural que forma los microfilamentos neuronales), proceso que se ha visto ampliamente relacionado con la actividad neuronal, en particular con la activación de receptores a glutamato (Lamprecht y LeDoux, 2004). En el proceso de diferenciación se han visto involucradas la sinaptofisina y la sinaptotagmina, que son moléculas relacionadas con la maduración y el anclaje de las vesículas sinápticas a la membrana de la terminal presináptica. Asimismo se ha observado la participación de las proteínas estructurales como las MAP (proteínas asociadas a los microtúbulos), a la α -tubulina (Garner et al 2002), las Rho GTPasas, las cuales participan en el crecimiento y división de dendritas (Lamprecht y LeDoux, 2004) y los factores neurotróficos (Seil y Drake-Baumann, 2000; Mu-ming Poo, 2001; Chao, 2003; Otal et al., 2005). Entre las proteínas que se han visto involucradas en la etapa de establecimiento de contactos se encuentran las llamadas Wnts, las cuales proveen información de posición, pueden ser secretadas tanto en las células presinápticas como en las

postsinápticas y parecen proporcionar señales tanto anterogradas como retrógradas cruciales en la coordinación del desarrollo y la especialización de la pre y postsinapsis. Las Wnts activan a los receptores de las caderinas (Packard, 2003). Esta serie de estudios poseen gran relevancia en el entendimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la reorganización sináptica del sistema nervioso.

Resumiendo, los cambios en la eficiencia sináptica dependientes de la actividad, pueden traducirse en modificaciones estructurales del sistema. En la presente investigación se observó el curso temporal dinámico de tales cambios, así, tras 3 días post-estimulación capaz de inducir LTP en el sistema de comunicación que va del giro dentado al área CA3 del hipocampo, no se presenta aún la reorganización sináptica de las fibras musgosas. La reorganización sináptica se observa hacia los 7 días post-estimulación conformando una banda de contactos sinápticos en la zona infrapiramidal del estrato oriens del área CA3 hipocampal, en ausencia de actividad epiléptica. Dicha reorganización es bilateral con carácter prominentemente contralateral. No obstante, la reorganización inicialmente observada hacia los 7 días post-estimulación experimenta modificaciones a través del tiempo presentando hacia el día 15 una apariencia bilateral que permanece al menos 75 días más.

Los resultados derivados del presente estudio constituyen una evidencia de la permanencia en el largo plazo de la reorganización sináptica dependiente de la actividad, así como de una progresión dinámica de los cambios estructurales generados en etapas adultas de la ontogenia de los organismos. Asimismo, se apoya la concepción de que los cambios morfológicos dependientes de la experiencia constituyen un mecanismo fundamental para el almacenamiento de la memoria a largo plazo.

Lo anterior confirma el postulado hecho por Santiago Ramón y Cajal en 1984, en torno a que nuestro cerebro experimenta modificaciones estructurales como producto de la experiencia. Esta visión conlleva implicaciones importantes para el estudio de los procesos mentales y para la psicología en general.

8. REFERENCIAS

- ◆ Abel T, Nguyen PV, Barad M, Deuel TA, Kandel ER, Bourtchouladze R, (1997) Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. *Cell* 88: 615–626.
- ◆ Abraham WC, Hugget A, (1997) Induction and reversal of long-term potentiation by repeated high frequency stimulation in rat hippocampal slices. *Hippocampus* 7: 137-145.
- ◆ Adams, B, Lee M, Fahnestock M, Racine RJ, (1997) Long-term potentiation trains induce mossy fiber sprouting. *Brain Research* 775: 193-197.
- ◆ Amaral DG, Dent JA, (1981) Development of the mossy fibers of the dentate gyrus: I. A light and electron microscopic study of the mossy fibers and their expansions. *Journal of Comparative Neurology* 195: 51–86.
- ◆ Amaral D, Witter M, (1995) Hippocampal formation, en Paxinos, G. (ed), *The Rat Nervous System*, Academic, Australia.
- ◆ Andrade JP, Madeira MD, Paula-Borbosa M, (1995) Evidence of reorganization in the hippocampal mossy fiber synapses of adult rats rehabilitated after prolonged undernutrition. *Experimental Brain Research* 104: 209-261.
- ◆ Andrade JP, Castanheira VAJ, Paz Díaz PG, Madeira MD, Paula-Borbosa M, (1996) The dendritic trees of neurons from the hippocampal formation of protein deprived adult rats. A quantitative Golgi study. *Experimental Brain Research* 109: 419-433.
- ◆ Aniksztejn L, Roisin M, Represa A, Ben-Ari Y, (1991) Trends in LTP research, en Baudry M, Davis J, (eds) *Long term Potentiation*, MIT Press.
- ◆ Artola A, Singer W, (1987) Long-term potentiation and NMDA receptors in rat visual cortex. *Nature* 330: 649–652.
- ◆ Asanuma H, Palvides C, (1997) Neurobiological basis of motor learning in mammals. *Neuroreport* 8: 1-6.
- ◆ Ascher PY, Nowak L, (1988) The role of divalent cations in the N-methyl-D-aspartate responses of mouse central neurons in culture. *Journal of Physiology* 399: 257-266.

- ◆ Bailey CH, Kandel ER, (1993) Structural changes accompanying memory storage. *Annual Review Physiology* 55: 397-426.
- ◆ Bailey CH, Kandel ER, Si K, (2004) The persistence of long-term memory: A molecular approach to self-sustaining changes in learning-induced synaptic growth. *Neuron* 44: 49-57.
- ◆ Barria A, Derkach VY, Soderling T, (1997) Identification of the Ca²⁺ calmodulina-dependent protein kinase liphophosphorilation site in the a-Amino-3-hidroxi-5-methyl-isoxazole-propionate type glutamate receptor. *Journal of Biological Chemistry* 272: 32727-32730.
- ◆ Bear M, Kirkwood A, (1993) Neocortical long-term potentiation. *Current Opinion in Neurobiology* 3:197-202.
- ◆ Bear MF, (1996) A synaptic basis for memory storage in the cerebral cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93:13453-13459.
- ◆ Bear M, Connors B, Paradiso M, (2001) Neuroscience: Exploring the brain. *Williams y Wilkins*, EUA.
- ◆ Bedi K, (1991) Effects of undernutrition during early life on granule cell numbers in the rat dentate gyrus. *Journal of Comparative Neurology* 3: 425-433.
- ◆ Ben-Ari Y, Gho M, (1988) Long lasting modification of the synaptic properties of rat CA3 hippocampal neurons induced by kainic acid. *Journal of Physiology* 404: 365-384.
- ◆ Ben-Ari Y, Represa A, (1990) Brief seizure episodes induce long-term potentiation and mossy fiber sprouting in the hippocampus. *Trends in Neuroscience* 13: 312-318.
- ◆ Bernasconi-Gastalla S, Wolfer D, Lipp H, (1994) Hippocampal mossy fibers and swimming navigation in mice: correlations with size and left right asymmetries. *Hippocampus* 4: 53-54.
- ◆ Bliss TV, Lomo T, (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *Journal of Physiology* 232: 331–356.
- ◆ Bliss TV, Collingridge GL, (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361: 31–39.
- ◆ Bramham CR, Southard T, Sarvey JM, Herkenham M, Brady LS, (1996) Unilateral LTP triggers bilateral increases in hippocampal

neurotrophin and Trk receptor mRNA expression in behaving rats: evidence for interhemispheric communication. *Journal of Comparative Neurology* 368: 371-82.

- ◆ Brose N, (1999) Synaptic cell adhesion proteins and synaptogenesis in the mammalian central nervous system; *Naturwissenschaften* 86: 516-524.
- ◆ Buchmaster PS, Wenzel HJ, Kunkel, DD, Schwartzkroin PA, (1996) Axon arbors and synaptic connections of hippocampal mossy cells in the rat In vivo. *Journal of Comparative Neurology* 366: 270-292.
- ◆ Buckmaster PS, Strowbridge BW, Schwartzkroin PA, (1993) A comparison of rat hippocampal mossy cells and CA3 pyramidal cells. *Journal of Neurophysiology* 70: 1281–1299.
- ◆ Buresova O, Bures J, (1979) Extinction of newly acquired conditioned taste aversion: effect of gustatory CS administered under anesthesia. *Behavioral Processes* 4: 329-339.
- ◆ Bryan G, Riesen A, (1989) Deprived somatosensory-motor experience in stump-tailed monkey neocortex: dendritic spine density and dendritic branching of layer IIB pyramidal cells. *Journal of Comparative Neurology* 288: 208-217.
- ◆ Calabresi P, Napolitano M, Centonze D, Marfia GA, Gubellini P, Teule MA, Berretta N, Bernardi G, Frati L, Tolu M, Gulino A, (2000) Tissue plasminogen activator controls multiple forms of synaptic plasticity and memory. *European Journal of Neuroscience* 12: 1002–1012.
- ◆ Carmichael S, (2003) Plasticity of cortical projections after stroke. *The neuroscientist* 9: 64-75.
- ◆ Castillo PE, Janz R, Südhof TC, Tzounopoulos T, Malenka RC, Nicoll RA, (1997) Rab3A is essential for mossy fibre long-term potentiation in the hippocampus. *Letters to Nature*, 5:590-593.
- ◆ Cavazos JE, Golari G, Sutula TP, (1991) Mossy fiber synaptic reorganization induced by kindling: time course of development, progression and permanence. *Journal of Neuroscience* 11: 2795-2803.
- ◆ Chao MV, (2003) Neurotrophins and their receptors: A convergent point for many signaling pathways. *Nature Reviews Neuroscience* 4: 299-309.

- ◆ Collier TJ, Routtenberg A, (1984) Selective impairment of declarative memory following stimulation of dentate gyrus granule cells: a naloxone-sensitive effect. *Brain Research* 310: 384-387.
- ◆ Collier TJ, Quirk GJ, Routtenberg A, (1987) Separable roles of hippocampal granule cells in forgetting and pyramidal cells in remembering spatial information. *Brain Research* 409: 316-328.
- ◆ Collingridge GL, Kehl SH, McLennan H, (1983) Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *Journal of Physiology* 334: 33-46.
- ◆ Commins S, Gigg J, Anderson M, O'Mara S.M, (1998) Interaction between paired-pulse facilitation and long-term potentiation in the projection from hippocampal area CA1 to the subiculum. *Neuroreport* 9: 4109-4113.
- ◆ Danscher G, (1981) Histochemical demonstration of heavy metals. A revised version of the sulphide method suitable for light and electromicroscopy. *Histochemistry* 71: 1-16.
- ◆ Dash PK, Hochner B, Kandel ER, (1990) Injection of the cAMP-responsive element into the nucleus of Aplysia sensory neurons blocks long-term facilitation. *Nature* 345: 718-721.
- ◆ Davis HP, Squire LR, (1984) Protein synthesis and memory: A review. *Psychology Bulletin* 96: 518-559.
- ◆ De Lanerolle NC, Kim J, Robbins R, Spencer D, (1989) Hippocampal interneuron loss and plasticity in human temporal lobe epilepsy. *Brain Research* 495: 387-395.
- ◆ Debanne D, Gahwiler BH, Thompson SM, (1996) Cooperative interactions in the induction of long-term potentiation and depression of synaptic excitation between hippocampal CA3-CA1 cells pairs in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93: 11225-11230.
- ◆ DeBassio WA, Kemper TL, Galler JR, Tonkiss J, (1994) Prenatal malnutrition effect on pyramidal and granule cell generation in the hippocampal formation. *Brain Research Bulletin* 35 (1): 57-61.
- ◆ Derrick BE, Weinberger SB, Martínez JL Jr, (1991) Opioid receptors are involved in NMDA receptor-independent mechanism of LTP induction at hippocampal mossy fiber-CA3 synapses. *Brain Research Bulletin* 27: 219-233.

- ◆ Derrick BE, Rodríguez SB, Lieberman DN, Martínez JL Jr, (1992) Mu opioid receptors are associated with the induction of hippocampal mossy fiber long-term potentiation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 263: 725-733.
- ◆ Diamond M, Lindner B, Raymon A, (1967) Extensive cortical depth measurements and neuron size increases in the cortex of environmentally enriched rats. *Journal of Comparative Neurology* 131: 357-364.
- ◆ Doyere V, Srebro B, Laroche S, (1997) Heterosynaptic LTD and depotentiation in the medial perforant path of the dentate gyrus in the freely moving rat. *Journal of Neurophysiology* 77: 571-578.
- ◆ Ebert U, Löscher W, (1995) Differences in mossy fiber sprouting during conventional and rapid amygdale kindling of the rat. *Neuroscience Letters* 190: 199-202.
- ◆ Edwards FA, (1995) LTP: a structural model to explain the inconsistencies. *Trends in Neuroscience* 18:250–255.
- ◆ Eichenbaum H, (1997) To cortex: thanks for the memories. *Neuron* 19:481-484.
- ◆ Eichenbaum H, (2004) Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. *Neuron* 44:109-120.
- ◆ Escobar ML, Barea-Rodríguez EJ, Derrick BE, Reyes JA, Martinez JL, (1997) Opioid receptor modulation of mossy fiber synaptogenesis: independence from long-term potentiation. *Brain Research* 27168: 1-7.
- ◆ Escobar ML, Chao V, Bermúdez-Rattoni F, (1998) In vivo long-term potentiation in the insular cortex: NMDA receptor dependence. *Brain Research* 779: 314-319.
- ◆ Fernández-Espejo E, (1996) Neurobiología básica de la formación hipocámpica. *Revisión Neurológica* 24: 779-784.
- ◆ Fiala BA, Joyce J, Greenough W, (1978) Environmental complexity modulates growth of granule cell dendrites in developing but not adult hippocampus of rats. *Experimental Neurology* 59: 372-383.
- ◆ Field PM, Zhou CF, Li Y, Raisman G, (1997) Endogenous synaptogenesis in the deafferented dentate gyrus does not exclude synapse formation by embryonic entorhinal transplants. *Brain Research* 751: 352-355.

- ◆ Frotscher M, Seress L, Schwerdtfeger WK, Buhl E, (1991) The mossy cells of the fascia dentata: a comparative study of their fine structure and synaptic connections in rodents and primates. *Journal of Comparative Neurology* 312:145–163.
- ◆ Frank JE, Pokorny J, Kunkel DD, Schwarzkroin PA, (1995) Physiologic and morphologic characteristics of granule cell circuitry in human epileptic hippocampus. *Epilepsia* 36: 543-558.
- ◆ Fujise N, Kosaka T, (1999) Mossy cells in the dentate gyrus: identification in the dorsal hilus and their distribution along the dorsoventral axis. *Brain Research* 816: 500-511.
- ◆ Gaarskjaer F, (1986) The organization and development of the hippocampal mossy fiber system. *Brain Research Reviews* 11: 335-357.
- ◆ Garner CC, Zhai G, Gundelfinger ED, (2002) Molecular mechanism of CNS synaptogenesis. *Trends in Neurosciences* 28: 243-250.
- ◆ Garrity PA, (1999) Signal transduction in axon guidance. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55: 1407-1415.
- ◆ Genisman Y, (2000) Structural synaptic modifications associated with hippocampal LTP and behavioral learning. *Cerebral Cortex* 10: 952-962.
- ◆ Hagiwara M, Brindle P, Harootunian A, Armstrong R, Rivier J, Vale W, (1993) Coupling hormonal stimulation and transcription via the cyclic AMP-responsive factor CREB is rate limited by nuclear entry of protein kinase A. *Molecular Cell Biology* 13: 4852-4859.
- ◆ Harris EW, Ganong AH, Cotman CW, (1984) Long term potentiation in the hippocampus involves activation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Research* 323: 132-137.
- ◆ Hebb DO, (1949) The Organization of Behavior. *Wiley*, EUA.
- ◆ Henze DA, Urban NN, Barrionuevo G, (2000) The multifarious hippocampal mossy fiber pathway: a review. *Neuroscience* 98: 407-427.
- ◆ Heynen AJ, Bear MF, (2001) Long-term potentiation of thalamocortical transmission in the adult visual cortex in vivo. *The Journal of Neuroscience* 21: 9801-9813.

- ◆ Hosokawa T, Rusakov DA, Bliss TVP, Fine A, (1995) Repeated Confocal Imaging of Individual Dendritic Spines in the Living Hippocampal Slice: Evidence for Changes in Length and Orientation Associated with Chemically Induced LTP. *The Journal of Neuroscience* 75: 5580-5573.
- ◆ Houser CR, Miyachiro J, Suvartz V, Walsh G, Rich J, Delgado-Escueta A, (1990) Altered patterns of dynorphin immunoreactivity suggest mossy fiber reorganization in the human hippocampal epilepsy. *The Journal of Neuroscience* 10: 267-282.
- ◆ Huang Y, Li XC, Kandel ER, (1994) cAMP contributes to mossy fiber LTP by initiating both a covalently mediated early phase and macromolecular synthesis dependent late phase. *Cell* 79: 69-79.
- ◆ Huang Y, Nguyen PV, Abel T, Kandel ER, (1996) Long-lasting forms of synaptic potentiation in the mammalian hippocampus. *Learning and memory* 3:74-85.
- ◆ Jahr CE, Stevens CF, (1987) Glutamate activates multiple single channel conductances in hippocampal neurons. *Nature* 325: 522-525.
- ◆ Kandel ER, Hawkins RD, (1992) The biological basis of learning and individuality. *Scientific American* 12: 49-67.
- ◆ Kandel ER, Jessel T, Schwartz JH, (1997) *Neurociencia y Conducta*, Prentice Hall.
- ◆ Kang H, Schuman EM, (1996) A requirement for local protein synthesis in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity. *Science* 273: 1402–1406.
- ◆ Kemperman G, Gage FH, (1999) New Nerve Cells for the Adult Brain. *Scientific American* 280: 48-67.
- ◆ Kennedy MB, Marder EM, (1992) Cellular and molecular mechanisms of neuronal plasticity, Introduction to molecular neurobiology, Hall Z.W. (ed) *Massachusetts: Sinauer Associates Inc.*
- ◆ Kleim JA, Barbay S, Cooper NR, Hogg TM, Reidel CN, Remple MS, Nudo RJ, (2002) Motor Learning-Dependent synaptogenesis is localized to functionally reorganized motor cortex. *Neurobiology of Learning and Memory* 77: 63-77.
- ◆ Knott GW, Quariaux C, Genou C, Welker E, (2002) Formation of dendritic spines with GABAergic synapses induced by whisker stimulation in adult mice. *Neuron* 34: 265-273.

- ◆ Kogan JH, Frankland P, Bendy JA, Coblentz J, Marowitz Z, Schutz G, Silva G, (1997) Spaced training induces normal long-term memory in CREB mutant mice. *Current Biology* 7: 1-11.
- ◆ Kretchatsky M, Ferhat L, Charton G, Bernard A, Pollard H, Represa A, Ben-Ari Y, (1995) Molecular correlates between reactive and developmental plasticity in the rat hippocampus. *Journal of Neurobiology* 26: 426-436.
- ◆ Lamprecht R, LeDoux J, (2004) Structural plasticity and memory. *Nature Neuroscience Reviews* 5: 45-64.
- ◆ Lee KS, Schlottler F, Oliver M, Lynch G, (1980) Brief bursts of high frequency stimulation produce two types of structural change in rat hippocampus. *Journal of Neurophysiology* 44 247–258.
- ◆ Lipp HP, Schwegler H, Crusio WE, Wolfer DP, Leisiner-Trigora M, Heimrich B, Driscoll P, (1989) Using genetically-defined rodent strains for the identification of hippocampal traits relevant for two-way avoidance behavior: a non-invasive approach. *Experientia* 45: 845-859.
- ◆ Losi G, Prybylowski K, Fu Z, Luo JH, Vicini S, (2002) Silent synapses in developing cerebellar granule neurons. *Journal of Neurophysiology* 8: 1263-1270.
- ◆ Lu YM, Jia Z, Janus C, Henderson JT, Gerlai R, Wojtowicz M, Roder J, (1997) Mice lacking metabotropic glutamate receptor 5 show impaired learning and reduced CA1 long-term potentiation (LTP) but normal CA3 LTP. *The Journal of Neuroscience* 17: 5196-5205.
- ◆ Lynd-Balta E, Pilcher WH, Joseph SA, (2004) AMPA receptor alterations precede mossy fiber sprouting in young children with temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 126: 105-114.
- ◆ Lysetskiy M, Földy C, Soltesz I, (2005) Long- and Short-Term Plasticity at Mossy Fiber Synapses in Mossy Cells in the rat Dentate Gyrus. *Hippocampus* 15: 691-696.
- ◆ Longo B, Covolán L, Chadi G, Eugênio L, Mello AM, (2003) Sprouting of mossy fibers and the vacating of postsynaptic targets in the inner molecular layer of the dentate gyrus. *Experimental Neurology* 181: 57-67.
- ◆ Lynch MA, (2004) Long-Term Potentiation and Memory, *Physiology Review* 84: 87-136.

- ◆ MacDermott AB, Mayer ML, Westbrook GL, Smith SJ, Barker JL, (1986) NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurons. *Nature* 321: 519-522.
- ◆ McClelland JL, McNaughton BL, O'Reilly RC, (1995) Why there are complementary learning systems in the hippocampus and neocortex: insights from the successes and failures of connectionist models of learning and memory. *Psychological Review* 102: 419–457.
- ◆ Malenka RC, (1994) Synaptic transmission and plasticity in the amygdale: An emerging physiology of fear conditioning circuits. *Cell* 78: 535-538.
- ◆ Marren S, (1996) Synaptic transmission and plasticity in the hippocampus: LTP and LTD. *Molecular Neurobiology* 13: 1-22.
- ◆ Marrone D, Petit T, (2002) The role of synaptic morphology in neural plasticity: structural interactions underlying synaptic power. *Brain Research Reviews* 38: 291–308.
- ◆ Martin SJ, Morris RGM, (2002) New life in an old idea: the synaptic plasticity and memory hypothesis revisited. *Hippocampus* 12: 609-636.
- ◆ Martínez JL, Derrik BE, (1996), Long Term Potentiation and Learning. *Annual Review Psychology* 47:173-203.
- ◆ Matthies H, (1989) In search of cellular mechanisms of memory. *Progress in Neurobiology* 32: 277-349.
- ◆ Mayford M, Wang J, Kandel ER, O'Dell TJ, (1995) CaMKII regulates the frequency-response function of hippocampal synapses for the production of both LTD and LTP. *Cell* 81: 891–904.
- ◆ Mayford M, Bach ME, Huang YY, Wang L, Hawkins RD, Kandel ER, (1996) Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene. *Science* 274: 1678–1683.
- ◆ McKerman MG, Shinnick-Gallagher P, (1997) Fear conditioning induces a lasting potentiation of synaptic currents in vitro. *Nature* 390: 607-611.
- ◆ Mello LE, Cavalheiro E, Tan AM, Kupfer WR, Pretorius J, Babb TL, Finch DM, (1993) Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. *Epilepsia* 34: 985-995.

- ◆ Milner B, Squire LR, Kandel E, (1998) Cognitive Neuroscience and the Study of Memory *Neuron* 20: 445-468.
- ◆ Mitsuno K, Sasa M, Ishihara K, Ishikawa M, Kikuchi H, (1994) LTP of mossy fiber-stimulated potentials in CA3 during learning in rats. *Physiology Behavior* 55: 633-638.
- ◆ Montarolo PG, Goelet P, Castellucci VF, Morgan J, Kandel ER, Schacher S, (1986) A critical period for macromolecular synthesis in long-term heterosynaptic facilitation in *Aplysia*. *Science* 234: 1249-1254.
- ◆ Morris B, Johnston H, (1995) A role for hippocampal opioids in long-term functional plasticity. *Trends in Neuroscience* 18: 350-355.
- ◆ Nakamura H, Kobayashi S, Ohashi Y, Ando S, (1999) Age-changes of brain synapses and synaptic plasticity in response to an enriched environment. *Journal of Neuroscience Research* 56: 307-315.
- ◆ Nicoll RA, Malenka RC, (1995) Contrasting properties of two forms of long term potentiation in the hippocampus. *Nature* 377:115-118.
- ◆ Nicoll RA, Schmitz D, (2005) Synaptic plasticity at Hippocampal mossy fiber Synapses. *Nature Reviews Neuroscience* 6:863-876.
- ◆ Nilsson M, Perfilieva E, Johansson U, Orwar O, Eriksson PS,(1999) Enriched Environment Increases Neurogenesis in the Adult Rat Dentate Gyrus and Improves Spatial Memory. *Journal of Neurobiology* 39: 569-578.
- ◆ Nguyen PV, Abel T, Kandel ER, (1994) Requirement of a critical period of transcription for induction of a late phase of LTP. *Science* 265: 1104–1107.
- ◆ Okazaki MM, Evenson DA, Nadler JV (1995) Hippocampal mossy fiber sprouting and synapse formation after status epilepticus in rats: visualization after retrograde transport of biocytin. *Journal of Comparative Neurology* 352: 515-534.
- ◆ O'Keefe J, Dostrovsky J, (1971) The hippocampus as a spatial map: Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Research* 34:171-175.

- ◆ Otal R, Martínez A, Soriano E, (2005) Lack of TrkB and TrkC signaling alters the synaptogenesis and maturation of mossy fiber terminals in the hippocampus. *Cell Tissue Research* 319: 349-358.
- ◆ Packard M, Mathew D, Budnik V, (2003) WNTs and TGF β in synaptogenesis: old friends signaling at new places. *Nature Reviews Neuroscience* 4:113-119.
- ◆ Paxinos G, Watson C, (1982) The rat brain in stereotaxic coordinates San Diego CA: *Academic Press*.
- ◆ Parnass Z, Tashiro A, Yuste R, (2000) Analysis of spine morphological plasticity in developing hippocampal pyramidal neurons. *Hippocampus* 10: 561-568.
- ◆ Peng HB, Yang JF, Dai Z, Lee CW, Hung HW, Feng ZH, Ko CP, (2003) Differential effects of neurotrophins and schwann cell-derived signals on neuronal survival/growth and synaptogenesis. *The Journal of Neuroscience* 23: 5050-5060.
- ◆ Pinel JP, (2000) Biopsicología, 4^a. ed., *Pearson*.
- ◆ Poo M, (2001) Neurotrophins as synaptic modulators. *Nature Reviews Neuroscience* 2: 24-32.
- ◆ Ramírez-Amaya V, Escobar ML, Chao V, Bermúdez-Rattoni F, (1999) Synaptogenesis of Mossy Fibers Induced by Spatial Water Maze Overtraining. *Hippocampus*. 9:631–636.
- ◆ Ramírez-Amaya V, Balderas I, Sandoval J, Escobar ML, Bermúdez-Rattoni F, (2001) Spatial Long- Term Memory Is Related to Mossy Fiber Synaptogenesis. *The Journal of Neuroscience* 21: 7340-7348.
- ◆ Ratzliff AH, (2002) Mossy cells in epilepsy: rigor mortis or vigor mortis?. *Trends in Neuroscience* 25: 140-144.
- ◆ Represa A, Tremblay E, Ben-Ari Y, (1989) Hippocampal plasticity in the kindling model of epilepsy. *Neuroscience Letters* 99: 345-350.
- ◆ Represa A, Ben-Ari Y, (1990) Brief seizure episodes induce long-term potentiation and mossy fiber sprouting in the hippocampus. *Trends in Neuroscience* 13: 312-318.
- ◆ Represa A, Ben-Ari Y, (1992) Kindling is associated with the formation of novel mossy fibre synapses in the CA3 region. *Experimental Brain Research* 92: 69-78.

- ◆ Represa A, Jorguera I, LeGal La Salle G, Ben-Ari Y, (1993) Epilepsy induced collateral sprouting of hippocampal mossy fibers: does it induce the development of ectopic synapses with granule cell dendrites? *Hippocampus* 3: 257-268.
- ◆ Roberts LA, Large CH, O'Shaughnessy CT, Morris BJ, (1997) Long-term potentiation in perforant path/granule cell synapses is associated with a post-synaptic induction of proenkephalin gene expression. *Neuroscience Letters* 227: 205-208.
- ◆ Rogan MT, Staubli UV, LeDoux JE, (1997) Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdale. *Nature* 390: 604-607.
- ◆ Routbort MJ, Bausch SB, McNamara JO, (1999) Seizures, cell death, and mossy fiber sprouting in kainic acid-treated organotypic hippocampal cultures. *Neuroscience* 94: 755-765.
- ◆ Saito S, Kobayashi S, Ohashi Y, Igarashi M, Komiya Y, Ando S, (1994) Decreased synaptic density in aged brains and its prevention by rearing under enriched environment as revealed by synaptophysin contents. *The Journal of Neuroscience Research* 39: 57-62.
- ◆ Scheff S, (2003) Reactive synaptogenesis in aging and Alzheimer's disease: lessons learned in the Cotman laboratory. *Neurochemical Research* 28: 1625-1630.
- ◆ Schwegler H, Mueller GG, Crusio WE, Szemes L, Seress L, (1993) Hippocampal morphology and spatially related Behavior in Long-Evans and CFY rats. *Hippocampus* 3: 1-8.
- ◆ Segal M, (2005) Dendritic spines and long-term plasticity. *Nature Reviews Neuroscience* 6: 277-284.
- ◆ Seil FJ, Drake-Baumann R, (2000) TrkB Receptor Ligands promote activity-dependent inhibitory synaptogenesis. *The Journal of Neuroscience* 20: 5367-5373.
- ◆ Seri B, García-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A, (2001) Astrocytes Give Rise to New Neurons in the Adult Mammalian Hippocampus. *The Journal of Neuroscience* 21:7153–7160.
- ◆ Shatz KJ, (1992) Desarrollo cerebral. *Investigación y Ciencia* 194: 17-24.
- ◆ Shors TJ, (2004) Memory of trace memories: Neurogenesis, synaptogenesis and awareness. *Trends in Neuroscience* 27: 250-256.

- ◆ Silva AJ, Kogan JH, Frankland PW, Kida S, (1998) CREB and memory. *Annual Reviews Neuroscience* 21: 127–148.
- ◆ Sorra K, Fiala JC, Harris KM, (1998) Critical Assessment of the Involvement of Perforations, Spinules, and Spine Branching in Hippocampal Synapse Formation. *Journal of Comparative Neurology* 398:225–240.
- ◆ Squire L, Zola-Morgan S, (1991) The medial temporal lobe memory system. *Science* 253:1380-1386.
- ◆ Squire L, (1992) Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys and humans. *Psychological Review* 99: 195-231.
- ◆ Sundstrom LE, Mitchel J, Wheal HV, (1993) Bilateral reorganization in the hippocampus induced by abnormal functional activity. *Science* 239: 1147-1150.
- ◆ Sutula T, He XX, Cavazos J, Scout G, (1988) Synaptic reorganization in the hippocampus induced by abnormal functional activity. *Science* 239: 1147-1150.
- ◆ Takehara K, Kawahara S, Kirino Y, (2003) Time-dependent reorganization of the brain components underlying memory retention in trace eyeblink conditioning. *Journal of Neuroscience* 23: 9897–9905.
- ◆ Thompson SM, (2000) Synaptic plasticity: Building memories to last. *Current Biology* 10: 218-221.
- ◆ Thompson KJ, Mata ML, Orfila JE, Barea-Rodríguez EJ, Martínez JL Jr, (2005) Metabotropic Glutamate Receptor antagonist AIDA blocks induction of mossy fiber-CA3 LTP in vivo. *Journal of Neurophysiology* 93, 2668-2673.
- ◆ Toni N, Buchs PA, Nikonenko I, Bron CR, Muller D, (1999) LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. *Nature* 402: 421-425.
- ◆ Tully T, (1991) Physiology of mutations affecting learning and memory in *Drosophila*: the missing link between gene product and behavior. *Trends in Neuroscience* 14: 163-164.
- ◆ Turner A, Greenough W, (1985) Differential rearing effects on rat visual cortex synapse per neuron. *Brain Research* 329:195-203.

- ◆ Tsumoto T, (1992) Long-term potentiation and long-term depression in the neocortex. *Progress in neurobiology* 39: 209-228.
- ◆ Urban NN, Barrionuevo G, (1996) Induction of hebbian and non-hebbian mossy fiber long-term potentiation by distinct patterns of high-frequency stimulation. *Journal of Neuroscience* 16: 4293-4299.
- ◆ Urban NN, Henze DA, Barrionuevo G, (2001) Revisiting the role of the hippocampal mossy fiber synapse. *Hippocampus* 11: 408-417.
- ◆ van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH, (2002) Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Letters to nature* 415:1030-1034.
- ◆ Verderio C, Coco S, Pravettoni E, Bacci A, Matteoli M, (1999) Synaptogenesis in hippocampal cultures. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55:1448–1462.
- ◆ Volkmar F, Greenough W, (1972) Rearing complexity affects branching of dendrites in the visual cortex of the rat. *Science* 176:1445-1447.
- ◆ Volpe BT, Davis HP, Towie A, Dunlap WP, (1992) Loss of hippocampal CA1 pyramidal neurons correlates with memory impairment in rats with ischemic or neurotoxin lesions. *Science* 176: 457-464.
- ◆ Vickery RM, Morris SH, Bindman LJ, (1997) Metabotropic glutamate receptors are involved in long-term potentiation in isolated slices of rat medial frontal cortex. *Journal of Neurophysiology* 78: 3039-3046.
- ◆ Wahlsten D, Lasalle JD, Bulman-Fleming B, (1991) Hybrid vigor and maternal environment in mice III, Hippocampal mossy fibers and behavior. *Behavioral Processes* 23: 47-57.
- ◆ Walsh RN, Budtz-Olsen O, Penny J, Cummings R, (1996) The effects of environmental complexity on the histology of the rat hippocampus. *Journal of Comparative Neurology* 137: 361-366.
- ◆ Wang JH, Stelzer A, (1996) Shared calcium signaling pathways in the induction of long-term potentiation and synaptic desinhibition in CA1 pyramidal cell dendrites. *Journal of Neurophysiology* 75 (4):1687-1702.
- ◆ Weiler IJ, Hawrylak N, Greenough WT, (1995) Morphogenesis in memory formation: synaptic and cellular mechanisms. *Behavioral Brain Research* 66: 1-6.

- ◆ Wiltgen BJ, Brown RAM, Talton LE, Silva AJ, (2004) New circuits for Old Memories: The role of the Neocortex in consolidation *Neuron* 44: 101-108.
- ◆ Wong C, (1997) A brain model with the circuit to convert short-term memory into long term memory. *Medical Hypotheses* 48: 221-226.
- ◆ Wuarin J, Dudek E, (1996) Electrographic seizures and new recurrent excitatory circuits in the dentate gyrus of hippocampal slices from kainite-treated epileptic rats. *Journal of Neuroscience* 16:4438-4448.
- ◆ Yin JC, Wallach JS, Del Vecchio M, Wilder EL, Zhou H, Quinn WG, Tully T, (1994) Induction of a dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in *Drosophila*. *Cell* 79: 49-58.
- ◆ Yuste R, Bonhoeffer T, (2004) Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging. *Nature Neuroscience Reviews* 5: 24-34.
- ◆ Zito K, Svoboda K, (2002) Activity-Dependent synaptogenesis in the adult Mammalian Cortex. *Neuron* 35: 1015-1017.