



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Instituto de Neurobiología

“EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A AMBIENTES FAMILIARES
O NOVEDOSOS SOBRE LA EXPRESIÓN SOSTENIDA DE
ARC Y LA ACTIVIDAD DE CAMPO LOCAL DEL
HIPOCAMPO DE LA RATA ADULTA”

Tesis para obtener el grado de

Maestro en ciencias (Neurobiología)

presenta

el Biol. J. Jesús Hernández Pérez

Campus Juriquilla, Querétaro. Abril 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Comité Tutorial certificamos que la tesis elaborada por: J. Jesús Hernández Pérez, cuyo título es: “Efecto de la exposición a ambientes familiares o novedosos sobre la expresión sostenida de *Arc* y la actividad campo local del hipocampo de la rata adulta” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Presidente
Dr. Rogelio Arellano Ostoá.

Secretario (Tutor)
Dr. Víctor Ramírez Amaya

Vocal
Dra. Limei Zhang

Suplente
Dr. Hugo Merchant Nancy

Suplente
Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera

Aprobado por el Comité Académico

Coordinador del Programa

AGRADECIMIENTOS A:

A los compañeros del laboratorio, Edgar, Arafat, Paola, Jimena, por su grata compañía.

A mis tutores:

Dra. Ma. Esther Olvera Cortés por toda su paciencia, apoyo y compromiso en mi desarrollo profesional.

Dr. Víctor Ramírez Amaya por blindarme su confianza, apoyo y por todo lo que aprendí en esta buena experiencia.

A mi comité tutorial, el Dr. Hugo Merchant Nancy y el Dr. Ataúlfo Martínez Torres, por sus valiosas aportaciones y su dedicación a la ciencia que es un ejemplo.

Al técnico de laboratorio de redes neuronales plásticas, Cutberto Dorado Mendieta, por su apoyo en el cuidado y manejo de animales del laboratorio, y su buena disposición.

A la ingeniera, Elsa Nydia Hernández Ríos perteneciente a la unidad de microscopía, por su apoyo en el manejo del equipo de microscopía confocal. De la misma manera al personal de la biblioteca, M.V.Z. Román Pacheco Barrita, Ángel Salazar Muro, Pilar Galarza Barrios y Rafael Silva Cruz, y al personal del bioterio, M.V.Z. Martín García Servín.

Al personal de enseñanza

Dra. Teresa Morales Guzmán

M. en C. Leonor Casanova Rico

Yolanda Orduña Cruz

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Becario No: 232364

DEDICATORIA:

En especial quiero dar un agradecimiento a mis Padres, ya que a ellos les debo todos mis logros actuales y los que aun en sueño están.

A mis Hermanos Javi y Beni, por que tengo en ellos dos amigos con quienes puedo contar, además de sus bromas y sus mejores intenciones

Y a Blanca, una persona especial que siempre ha estado a mi lado y con quien he compartido este pedacito de vida, la cual ha llenado de color.

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Víctor Ramírez Amaya y la Dra. Ma. Esther Olvera Cortés.

El trabajo experimental se desarrolló en los laboratorios de:

Redes Neuronales Plásticas a cargo del Dr. Víctor Ramírez Amaya dentro del Instituto de Neurobiología de la UNAM, campus Juriquilla Querétaro.

Neurofisiología Experimental a cargo de la Dra. María Esther Olvera Cortés, dentro del Centro de Investigación Biomédica de Michoacán del Instituto Mexicano del Seguro Social (CIBIMI)-IMSS, en Morelia Michoacán.

RESUMEN

Después de la exploración de un ambiente novedoso el giro dentado es la única estructura hipocampal en la que, las neuronas expresan de forma sostenida (hasta 8 horas) el ARNm de *Arc/Arg 3.1* y la proteína de *Arc/Arg 3.1*. El significado funcional de este fenómeno no es conocido. Sin embargo, con base en la evidencia previa que demuestra la importancia de *Arc/Arg 3.1* en los procesos de la plasticidad sináptica y en la consolidación de memorias, así como la participación del giro dentado en la formación de las nuevas memorias, se sugirió que la expresión sostenida de *Arc/Arg 3.1* podría ser inducida durante la formación de una nueva memoria para facilitar su estabilización y/o consolidación. Para probar esta hipótesis se analizó el porcentaje de células que expresaron *Arc/Arg 3.1*, a las 1, 8 y 24 horas posteriores a la exposición (laberinto de campo abierto) a un ambiente novedoso o un ambiente familiar. Los resultados mostraron que en ambas condiciones se generó la expresión sostenida de *Arc/Arg 3.1*. Sin embargo, en la condición familiar el porcentaje de neuronas que expresaron *Arc/Arg 3.1* de forma sostenida fue menor y mas duradera (hasta 24 horas después del evento) con respecto a la condición novedosa. Para determinar si este fenómeno se asoció con la actividad de la red local del giro dentado, se analizó la actividad oscilatoria en las mismas ventanas temporales. Los resultados experimentales indicaron que existió un cambio en el patrón de la actividad theta en la fase de sueño de movimientos oculares rápidos (MOR) y también en las conductas motoras a las ocho horas después de la experiencia familiar. Estos fenómenos coincidieron con la disminución en la proporción de neuronas que expresa *Arc/Arg 3.1* de forma sostenida. De acuerdo a los resultados mostrados en este estudio, se sugirió que existe una relación entre ambos fenómenos, y que la coordinación entre estos puede jugar un papel importante en el establecimiento de los mecanismos fisiológicos que sustentan a la estabilización y/o consolidación de una nueva memoria.

ABSTRACT

Dentate gyrus is the only hippocampal structure that express a sustained pattern of RNA *arc/arg 3.1* and its protein product after the exposure to a novel environment. The functional significance of this phenomenon is still unclear. However, based on the evidence that the Arc/Arc 3.1 protein participates in synaptic plasticity processes and memory consolidation, as well as the new memory formation related with dentate gyrus , it has been hypothesized that sustained expression of Arc/Arc 3.1 could be related to the formation of new memory and/or facilitate its stabilization (consolidation). To test this hypothesis, the percent of granule cells expressing Arc/Arc 3.1 at 1, 8 and 24 hours after the exposure to a new environment (an open field maze) or to a familiar environment (the open field maze after a familiarization process) were analyzed. Under both conditions a sustained pattern of expression of Arc/Arc 3.1 was observed. However after the exposure to the familiar environment, a minor percent of neurons presented the sustained expression but its duration was longer (up to 24 hours after de event) compared to the group of novel environment exposure. In order to determine whether the sustained expression of Arc/Arc 3.1 is related with the local network electrical activity of dentate gyrus, the field electrical activity was recorded at 1, 8 and 24 hours after the exposure to the novel or familiar environments. Changes in the pattern of theta activity recorded during REM sleep and motor behavior (rearing and displacement) were observed 8 hours after the exposure to the familiar environment, the time-point in which the reduction in the proportion of neurons expressing Arc/Arc 3.1 was observed, concerning the novel environment exposure condition. According to the results shown in this study, it was suggested that a relationship exists between the two phenomena, and that coordination between these can play an important role in establishing the physiological mechanisms that support the stabilization and / or strengthening of a new memory.

ÍNDICE

Agradecimientos.....	III
Resumen en español.....	VI
Resumen en Ingles.....	VII
1.- INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.- Hipocampo y memoria.....	1
1.2.- Caracterización de Arc/Arg 3.1.....	6
1.3.- Papel de Arc/Arg 3.1 en la regulación homeostática de la eficacia sináptica.....	8
1.4.- Expresión de Arc/Arg 3.1 en las neuronas relacionadas con la conducta.....	9
1.5.- Identificación de los códigos poblacionales a través de la dinámica de expresión de Arc/Arg 3.1.....	10
2.- ANTECEDENTES.....	11
2.1.- Propiedades del código neural en el hipocampo a través de la identificación del ARNm <i>Arc/Arg 3.1</i> y de la proteína Arc/Arg 3.1.....	11
2.2.- Modelos y evidencia experimental acerca del papel del giro dentado en los procesos de la memoria y el aprendizaje.....	16
2.3.- Interacción entre las redes neuronales a través del análisis de la actividad de campo local.....	20
2.4.- Origen de la actividad de campo local del hipocampo.....	21
2.5.- Sincronización de las poblaciones neuronales a través de la actividad oscilatoria de campo local.....	23
3.- JUSTIFICACIÓN (A,B).....	19 y 26
4.- HIPÓTESIS.....	27
5.- OBJETIVOS.....	28
6.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	29
6.1.- Lote experimental.....	29
6.2.- Procedimiento Quirúrgico.....	29
6.3.- Evaluaciones conductuales.....	30
6.4.- Registro del EEG hipocampal.....	30
6.5.- Análisis de la actividad de campo local.....	31
6.6.- Expresión sostenida de Arc/Arg 3.1.....	32

6.7.- Histología.....	32
6.8.- Estadística.....	35
7.- RESULTADOS.....	36
7.1.- Expresión de Arc/Arg 3.1 en el giro dentado.....	36
7.2.- Actividad de campo local.....	39
7.3.- Cinética temporal de la actividad oscilatoria asociada a la exposición de un ambiente novedoso y de un ambiente familiar.....	41
7.3.1.- Actividad oscilatoria del giro dentado.....	42
7.3.1.1.- Sueño MOR.....	42
7.3.1.2.- Sueño de ondas lentas.....	43
7.3.1.3.- Conductas motoras (desplazamiento y erguidas).....	44
7.3.1.4.- Atento-Quieto.....	45
7.3.2.- Actividad oscilatoria del área de CA3.....	46
7.3.2.1.- Sueño MOR.....	46
7.3.2.2.- Sueño de ondas lentas.....	48
7.3.2.3.- Conductas motoras (desplazamiento y erguidas).....	49
7.3.2.4.- Atento-Quieto.....	50
8.- DISCUSIÓN.....	52
8.1.- Papel de la expresión sostenida de Arc/Arg 3.1 en el giro dentado.....	52
8.2.- Efecto de la experiencia conductual sobre los patrones de actividad oscilatoria de las redes hipocampales.....	54
8.2.1.- Modificaciones en la actividad oscilatoria durante el sueño y su relación con los cambios en el patrón de la expresión sostenida de Arc/Arg 3.1.....	56
8.2.2.- Modificaciones en la actividad oscilatoria dentro de los estados conductuales de vigilia-alerta inducidas por una experiencia previa.....	59
9.- CONCLUSIÓN.....	60
10.- REFERENCIAS.....	61
11.- ÍNDICE DE TABLAS.....	69

1. INTRODUCCIÓN

1.1.- Hipocampo y memoria

La memoria y el aprendizaje son capacidades cognoscitivas que requieren de la coordinación temporal de diversos circuitos neuronales que participan en procesos discretos asociados a la adquisición, almacén y recuperación de la información relacionada con las experiencias vividas (Buzsaki, 2006; Fuster, 1997).

Una amplia cantidad de trabajos han demostrado la importancia que tiene el hipocampo en la formación y la consolidación de los trazos de la memoria declarativa de largo plazo. Por ejemplo, se ha observado que la lesión hipocampal en humanos produce severas deficiencias en la capacidad de consolidación de las nuevas memorias, así cómo en la evocación de las memorias almacenadas recientemente (Scoville y Milner, 1957). En otros animales se ha demostrado que el hipocampo es indispensable para la formación de la memoria declarativa de tipo espacial, ya que la lesión hipocampal produce severas deficiencias en la ejecución de las tareas que requieren de este tipo de memoria. Por ejemplo, los primates y los roedores con lesión hipocampal pierden la capacidad de recordar información acerca de los lugares y/o de la localización de objetos dentro de lugares particulares (Buckley y Gaffan, 2000; Burgues et al, 2002; Jarrard, 1993).

Mediante ensayos experimentales Tolman (1948) observó que los animales pueden navegar de manera flexible dentro de un ambiente y sugirió que entre los atributos fundamentales de esta conducta adaptativa se encuentra el almacenar y utilizar eficientemente las representaciones del espacio adquiridas. En conclusión Tolman propuso que los animales pueden realizar una representación interna del ambiente a la cual llamó mapa cognoscitivo.

Posteriormente O'Keefe y Dostrovsky (1971) descubrieron un tipo de neuronas en el hipocampo que tienen la propiedad de activarse específicamente sólo cuando el animal camina sobre una región restringida

del ambiente, y basándose en las hipótesis de Tolman nombraron a estas neuronas cómo células de lugar (figura 1). Estudios posteriores más detallados, mostraron que el conjunto poblacional de las células activas, es capaz de producir la representación total del ambiente (Wilson y McNaughton, 1993).

A partir de la evidencia experimental obtenida por medio de los estudios de lesión y electrofisiológicos (mediante el descubrimiento de las células de lugar), se propuso que el hipocampo es el sitio donde se realizan las representaciones internas del espacio, o mapas cognoscitivos.



Figura 1.- Célula de lugar. Representación esquemática de una rata explorando un área circular con señales externas. Dentro del área circular se encuentra un campo de lugar, que es el campo receptivo de una célula principal del hipocampo. La célula va incrementando su tasa de disparo con forme el animal se acerca al centro del campo de lugar. La intensidad de color rojo en la barra ilustra el incremento en la tasa de disparo de la neurona registrada (O'Keefe y Dostrovsky, 1971).

El mecanismo celular que subyace a la representación de las experiencias adquiridas fue elegantemente propuesto por Hebb (1949), quien postuló que la representación de cualquier estímulo o unidad mínima de información es codificada mediante la actividad coordinada de un grupo de neuronas dentro de un circuito local denominado ensamble, y que a su vez el patrón de activación secuencial de varios ensambles (a través de un proceso llamado secuencia de fase), es el responsable de la representación de la información de un evento completo. Por lo tanto, la actividad coordinada de un grupo de neuronas dentro del circuito hipocampal, puede ser la responsable de la representación espacial del ambiente. Hebb, también sugirió que tal representación se almacena a través de la generación de los cambios estructurales que fortalecen las conexiones sinápticas entre las neuronas

activas. De tal manera que la activación sincrónica entre dos neuronas produce una asociación funcional entre estas, lo cual trae como consecuencia que la actividad de una neurona facilite la activación de la otra. Estos procesos de asociación pueden ser capaces de almacenar el patrón de activación neuronal codificado durante un evento conductual. De esta forma, la representación o el recuerdo del mismo evento se puede establecer gracias a la capacidad de reproducir el mismo patrón de activación neuronal del ensamble (Hebb, 1949). Para ello Hebb propuso así el siguiente postulado:

“Cuando el axón de una célula A está lo bastante cercano a una célula B como para excitarla y participa repetida y persistentemente en su disparo, tiene lugar algún proceso de crecimiento o cambio metabólico en una o ambas células, de modo que la eficiencia de A, como una de las diversas células que hace disparar a B, aumenta (Hebb, 1949).”

El descubrimiento de la “potenciación de largo plazo” (PLP) le dio sustento empírico al postulado Hebbiano. La PLP es una forma de plasticidad sináptica que depende de la actividad coordinada entre la neurona presináptica y postsináptica (Bliss y Lomo, 1973). Esta se caracteriza por un aumento en la respuesta postsináptica, desencadenado por la estimulación repetitiva de la neurona presináptica (Fig.2).

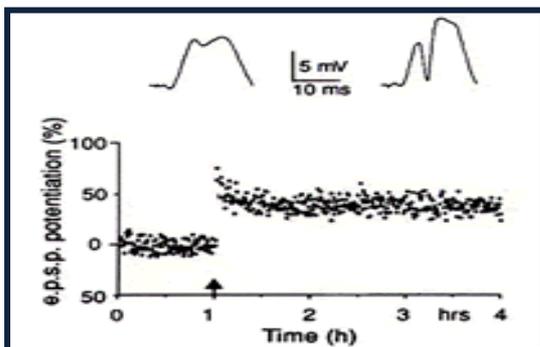


Figura 2: PLP. El primer reporte de la PLP fue descrito en la conexión de la vía perforante con el giro dentado. Después de la estimulación de alta frecuencia, se incrementa la magnitud de la respuesta postsináptica, la cual se mantuvo, hasta por un periodo de 4 horas posterior a la estimulación (la flecha negra indica el momento de la estimulación). (Bliss y Lomo, 1973).

La PLP se ajusta a los mecanismos de asociación sináptica necesarios para la formación de la memoria propuestos por Hebb (1949), ya que los ensambles transitorios con fuertes conexiones excitatorias producen cambios en la conectividad de la red mediante un proceso de asociación sináptica. Los eventos moleculares que permiten el mantenimiento en el largo plazo de los

cambios en la plasticidad sináptica, cómo la PLP, se inician a través del incremento en la concentración de calcio dependiente de la apertura de los receptores NMDA en las espinas dendríticas. El aumento en la concentración del calcio se traduce en la activación de proteínas cinasas cómo la CaMKII (cinasa 2 dependiente de calcio-calmodulina), que de manera inmediata tienen efectos sobre la excitabilidad neuronal de corto plazo por medio de la fosforilación de los receptores a glutamato (Barria et al., 1997), y en el largo plazo, a través de la fosforilación de los factores de transcripción que desencadena la expresión de genes asociados con el mantenimiento en el largo plazo de los cambios plásticos (Abraham et al., 1991). Actualmente se está realizando una exhaustiva investigación enfocada en la identificación y caracterización de los genes y las proteínas que se expresan debido a la actividad sináptica y que juegan un papel importante en los cambios plásticos de largo plazo y en la formación de la memoria.

Después de un evento conductual o de la aplicación de un estímulo eléctrico a las neuronas, éstas activan su maquinaria transcripcional para inducir la expresión de genes de expresión inmediata (GEI). Estos genes han sido categorizados en dos clases funcionales: a) Factores de transcripción regulatorios, que se caracterizan por controlar la transcripción de otros genes (dentro de esta división se encuentran genes como *c-fos*, *c-jun*, y *zif268*) (Tischmeyer y Grimm, 1999); b) GEI efectores, estos genes ejercen un efecto directo sobre la función celular. Dentro de esta última categoría se encuentran genes asociados al crecimiento celular (*BDNF*, *narp*), de señalización intracelular (*Rheb*, *RGS-2* y *Homer 1a*), de modificación estructural (*Arc/Arg 3.1*, *Homer 1a*, *narp*, *BDNF*) y de metabolismo (*COX-2*) (Lanaha y Worley 1998; Guzowski, 2002). Mediante la caracterización de estos genes, se han identificado GEI que se expresan específicamente en neuronas que participan en la representación de la información procesada, los cuales no son inducidos por la influencia de otros factores cómo el estrés o la actividad motora *per se*, y acompañan a la codificación de una experiencia conductual (Guzowski et al., 1999).

Entre estos genes podemos incluir a *Arc/Arg 3.1* y a *Homer 1a*. El gen *Arc/Arg 3.1* ha despertado un interés especial debido a que participa en los procesos plásticos, y en la consolidación de la memoria de largo plazo. Entre las pruebas que sustentan su participación en dichos procesos, existen estudios que muestran que la interferencia con la traducción a proteína de este gen produce severas deficiencias en la formación de la memoria de largo plazo, así como en la estabilización en el largo plazo de los cambios en la eficacia sináptica (Bramham, 2008). Debido a éstos atributos se ha considerado a la expresión de este gen y de su producto proteico como marcadores de la actividad neuronal, de tal manera que identificando a las células que lo expresan es posible conocer a las unidades neuronales que fueron activadas por un evento conductual dentro de circuitos específicos.

La dirección del conocimiento en el área de las neurociencias cognoscitivas que estudia a los genes de expresión temprana, y en particular el gen *Arc/Arg 3.1* está abocada a dos objetivos específicos: El primero es conocer la dinámica de las redes neuronales a través de la identificación y caracterización de neuronas que expresan el gen *Arc/Arg 3.1*. Por que dicho análisis permite entender el comportamiento de los códigos poblacionales a nivel neuronal (Guzowski et al., 1999, Vazdajanova et al., 2002, Ramirez-Amaya et al., 2005, Kubik et al., 2007).

Además, si la expresión de este gen depende del procesamiento de la información que se relaciona a la función de la red, es razonable sugerir que el producto de este gen es necesario para que las redes neuronales puedan funcionar de manera eficiente.

Por lo tanto, el segundo objetivo es conocer cual es el papel funcional de la proteína Arc dentro de las redes neuronales. Una de las formas de averiguarlo es a través de experimentos moleculares y/o conductuales que afecten o controlen su dinámica de expresión, ya que esto nos puede brindar una idea acerca del papel funcional que tiene Arc dentro de los circuitos neuronales.

1.2.- Caracterización de Arc/Arg 3.1

Arc/Arg 3.1, es un gen de expresión temprana que fue descubierto a través de la aplicación de los protocolos de estimulación eléctrica que inducen la potenciación de largo plazo en el hipocampo (Lyford et al., 1995; Link et al., 1995). El ARNm de *Arc/Arg 3.1*, es el único transcrito reciente conocido que se traslada a las dendritas estimuladas dentro de la ventana temporal en la que se requiere de la síntesis de proteínas para el mantenimiento de la PLP (Figura 3) (Lyford et al., 1995; Link et al., 1995; Steward et al., 1998).

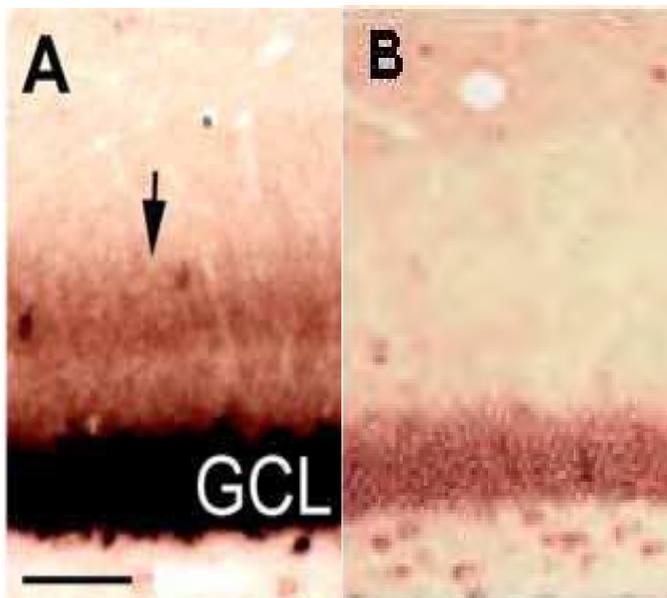


Figura 3.- Arc en dendritas.- Localización de ARNm de *Arc/Arg 3.1* A) Después de la estimulación de la vía perforante (principal entrada al giro dentado), se observa la presencia del ARNm de *Arc/Arg 3.1* en la región dendrítica donde hacen contacto las fibras estimuladas. Esta evidencia indica que el RNAm de *Arc/Arg 3.1* es transportado a la región dendrítica estimulada. B).- En condiciones control donde la dendrita no es estimulada, no se expresa el RNAm de *Arc*. Las flechas negras indican el RNAm de *Arc* (Huang et al., 2007).

De manera semejante, la actividad sináptica produce la acumulación de la proteína Arc en las espinas que se localizan en el dominio dendrítico activado (Moga et al., 2004). En base a este comportamiento, se ha sugerido que la expresión de la proteína Arc/Arg 3.1 enlaza a los procesos de la plasticidad sináptica dependientes de la síntesis de proteínas con los patrones de la actividad sináptica generados por la experiencia (Bramham, 2008).

Las dinámicas de actina (polimerización y despolimerización de los filamentos de actina) son esenciales en los procesos de remodelación sináptica que subyacen a la plasticidad sináptica de largo plazo. Estudios tempranos revelaron que Arc/Arg 3.1 co-precipita con la actina polimerizada (Lyford et al.,

1995). Sin embargo, Arc/Arg 3.1 y actina no coexisten intracelularmente, ni se ha observado la co-precipitación de actina no-polimerizada con Arc/Arg 3.1. Por lo cual se ha sugerido la existencia de una proteína intermediaria que permita la interacción de Arc/Arg 3.1 con actina polimerizada. Experimentos recientes muestran que para que ocurra un alargamiento estable de las espinas dendríticas y el mantenimiento de la PLP, se necesita de la síntesis de proteínas, y de la polimerización de actina (Fukazawa et al., 2003; Takana et al., 2008).

Como se ha mencionado anteriormente, el mantenimiento de la PLP necesita de la traducción a proteína de los genes de expresión inmediata como *Arc/Arg 3.1* (Guzowski, 2002). En este contexto Messaoudi et al. (2007) mostraron la dinámica funcional de Arc/Arg 3.1 en el mantenimiento de la PLP *in vivo* a través de la infusión de un oligodeoxinucleotido antisentido contra el ARNm de *Arc/Arg 3.1*. Este fue aplicado en diferentes puntos temporales después de la estimulación de alta frecuencia en la vía perforante que induce la PLP en el giro dentado. Los autores encontraron que cuando se aplicó la secuencia antisentido para el ARNm de *Arc/Arg 3.1* a los 15 minutos después de la estimulación se produjo una inhibición pasajera de la PLP, sugiriendo con esto que Arc/Arg 3.1 participa en la inducción de la PLP.

Por otra parte, la aplicación de la secuencia antisentido a las dos horas después de la estimulación produjo un abatimiento completo de la PLP (lo cual demuestra que el establecimiento de la PLP es dependiente de la expresión de la proteína Arc). Adicionalmente estos autores mostraron que la aplicación del oligodeoxinucleotido antisentido contra el ARNm de *Arc/Arg 3.1* inducía la desfosforilación de cofilina hiperfosforilada y una disminución en la concentración de actina polimerizada. De esta manera los autores propusieron que *Arc/Arg 3.1* es un gen de expresión temprana asociado con la expansión de F-actina en la fase estable de la PLP (Messaoudi et al., 2007). Aunque no se conoce el mecanismo por el cual Arc/Arg 3.1 interactúa con la cofilina, si podemos afirmar que Arc/Arg 3.1 es una proteína importante para su regulación.

1.3.- Papel de Arc/Arg 3.1 en la regulación homeostática de la eficacia sináptica

También se ha observado que la proteína Arc/Arg 3.1 interactúa con dos proteínas que participan en la endocitosis de receptores, la dinamina y la endofilina. Experimentos recientes mostraron que cuando las proteínas de Arc/Arg 3.1 y endofilina se co-expresan en neuronas, estas se asocian en vesículas que trafican selectivamente a los receptores de glutamato del tipo AMPA (AMPA receptors). Adicionalmente se ha mostrado que la expresión transgénica de Arc/Arg 3.1 incrementa la tasa de endocitosis de los receptores AMPA, reduce el nivel de los receptores AMPA de la superficie, y produce una disminución en la respuesta sináptica mediada por los receptores AMPA. Por lo cual, esta evidencia demuestra que la fluctuación en la concentración de Arc, es capaz de generar cambios en la excitabilidad neuronal a través de la dinámica de los receptores AMPA (Chowdhury et al., 2006). De la misma manera se ha observado que las neuronas knockout (KO) para Arc, muestran una disminución en la tasa de endocitosis, la cual se acompaña de un incremento en los niveles de los receptores AMPA de la superficie y un aumento en la amplitud de las corrientes postsinápticas excitatorias miniatura (CPSEm) dependiente de los receptores AMPA (Chowdhury et al., 2006). En un estudio complementario se encontró que la remoción de los receptores de la superficie de tipo AMPA generada por la sobreexpresión de Arc/Arg 3.1, es específica para los receptores compuestos por las sub-unidades GluR2 y GluR3, y que esta clase de receptores es la responsable de la disminución de las CPSEm (Rial Verde et al., 2006). En trabajos realizados a la par se demostró que la proteína Arc/Arg 3.1 medía el escalamiento homeostático de los receptores AMPA, ya que se encontró que el incremento de la concentración de la proteína Arc/Arg 3.1 bloquea la sobrerregulación de los receptores AMPA de la superficie y disminuye las CPSE mediadas por los receptores AMPA que fueron inducidas por la inactividad crónica (Shepherd et al., 2006). Mientras que en neuronas knockout para Arc/Arg 3.1, se generó un incremento escalado en la concentración de los receptores AMPA y un aumento en la amplitud de las CPSE mediadas por los receptores AMPA, que asemejó a las CPSE producidas por la inactividad crónica (Shepherd et al.,

2006). En conclusión los autores sugirieron que la proteína de Arc juega un papel preponderante en el escalamiento homeostático de la fuerza sináptica a través de un mecanismo que acopla a la actividad sináptica con la endocitosis de los receptores AMPA (Shepherd et al., 2006).

De esta manera podemos concluir que la proteína de Arc participa en los procesos de la plasticidad sináptica debido a que:

- Participa en la inducción y mantenimiento de la PLP.
- Participa en el control de las dinámicas de actina que promueven cambios estructurales dependientes de la actividad sináptica.
- Participa en el escalamiento sináptico homeostático a través de la endocitosis de receptores AMPA.

1.4.- Expresión de Arc/Arg 3.1 en las neuronas relacionadas con la conducta

Una amplia cantidad de experimentos han demostrado que el gen *Arc/Arg 3.1* se expresa específicamente en las neuronas que participan en el procesamiento de información de una experiencia conductual (Guzowski, 1999, Vazdajanova 2002, Ramírez-Amaya 2005). En el hipocampo, se ha encontrado que la proporción de neuronas que responde electrofisiológicamente durante la representación de un ambiente discreto en cada región hipocampal, es la misma que expresa el gen *Arc/Arg 3.1*. Por ejemplo, las áreas CA1, CA3 y giro dentado, responden a través de la actividad de células de lugar con un 40, 20, y 2% de la población de neuronas. Esta proporción se conserva en cada área hipocampal cuando se analiza el porcentaje de neuronas que expresan *Arc/Arg 3.1*, (Wilson and McNaughton., 1993; Vazdarjanova et al., 2002, Ramírez-Amaya et al., 2005).

Esto sugiere que la población de células que expresa *Arc/Arg 3.1* corresponde a la misma población de células que responde electrofisiológicamente a la conducta.

1.5.- Identificación de los códigos poblacionales a través de la dinámica de expresión de Arc/Arg 3.1

Mediante el desarrollo de una poderosa técnica llamada “Análisis Compartamental de la Actividad Temporal por Hibridación *in situ* Fluorescente” (catFISH, por sus siglas en inglés), se puede identificar a las poblaciones neuronales que responden ante dos situaciones conductuales discretas. Esta capacidad se obtiene por la dinámica de la transcripción y de la traslocación citoplasmática del ARNm de *Arc/Arg 3.1*. Cuando una neurona se activa electrofisiológicamente, se puede observar el ARNm de *Arc/Arg 3.1* localizado en el núcleo entre un periodo de tiempo de 2 a 5 minutos después de la activación. El ARNm se observa como dos puntos que corresponden a la transcripción de los alelos del gen (figura 4a). Si se analiza el ARNm de Arc a los 30 minutos después de que la neurona fue activada, este se encontrará en el citoplasma (debido al proceso de traslocación) (Fig 4b). De igual forma, las neuronas que fueron activadas en los dos puntos temporales, presentarán el ARNm tanto en el núcleo, como en el citoplasma (Fig. 4c) (Guzowski et al., 1999).

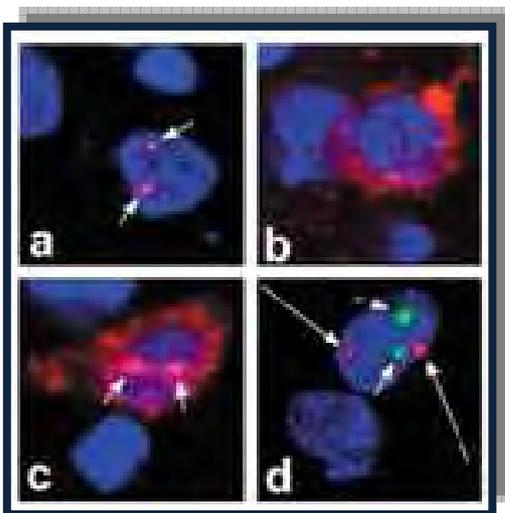


Figura 4. Dinámica temporal de la expresión del gen de *Arc/Arg 3.1*. Hibridación *in situ* fluorescente para *Arc/Arg 3.1* (en Rojo) y *Homer1a* (en Verde), el núcleo de las células esta teñido con DAPI (Azul). La presencia de *Arc/Arg 3.1* en el núcleo (a) se debe a expresión inducida aproximadamente 5min antes de colectar el tejido, mientras que la presencia de Arc en el citoplasma (b) se debe a actividad que ocurrió 30min antes. La co-localización de *Arc/Arg 3.1* en el citoplasma (c) u *Homer1a* en el núcleo (d) con *Arc/Arg 3.1* en el núcleo se debe a que la célula se activo en ambas ocasiones (tomado de Guzowski, et al., 1999).

La técnica de “catFISH” permitió visualizar a los ensambles neuronales activados por dos experiencias conductuales discretas en una prueba experimental que consistió en someter a los animales a dos sesiones de exploración. Un grupo de animales exploró el mismo ambiente en las dos ocasiones, y el otro grupo exploró dos ambientes diferentes. Para discriminar

entre las poblaciones activas en los dos eventos discretos, el primer evento de exploración ocurrió a los 30 minutos antes del sacrificio (ARNm de *Arc/Arg 3.1* citoplasmático) y el segundo evento ocurrió a los 5 minutos antes del sacrificio (ARNm de *Arc/Arg 3.1* nuclear). Cuando se analizó a las poblaciones neuronales activas en los dos eventos, se encontró que el grupo de animales que exploró el mismo ambiente, activó la misma población de neuronas en ambas situaciones, mientras que el grupo que exploró a los ambientes diferentes, activó dos poblaciones neuronales distintas; sin embargo una subpoblación común fue activada en ambos eventos (Guzowski et al., 1999, Vazdajanova et al., 2002, Ramírez-Amaya et al., 2005).

De manera similar, resultados electrofisiológicos demuestran que la exploración de dos ambientes diferentes, activa ensamblajes neuronales distintos, mientras que la exploración hacia el mismo ambiente en dos ocasiones distintas, recluta a la misma población de neuronas en ambas situaciones (Muller y Kubie, 1987; Leutgeb et al., 2005).

La ventaja de utilizar al gen de expresión inmediata *Arc/Arg 3.1*, para estudiar códigos poblacionales, es que podemos visualizar la actividad de toda la población neuronal con una resolución subcelular (por medio de la identificación del ARNm y/o de la proteína en el compartimento nuclear y el citoplasmático), que nos permite conocer la conducta de los ensamblajes neuronales ante dos experiencias conductuales discretas.

2.- ANTECEDENTES

2.1.- Propiedades del código neural en el hipocampo a través de la identificación del ARNm de *Arc/Arg 3.1*, y la proteína de *Arc/Arg 3.1*

Para detectar a las poblaciones neuronales del hipocampo activadas por eventos conductuales discretos, se utilizó una extensión de la técnica catFISH, en la cual se combinó la hibridación *in situ* fluorescente con la inmunohistoquímica fluorescente para detectar el ARNm de *Arc/Arg 3.1* y la proteína de *Arc/Arg 3.1*, respectivamente (Ramírez-Amaya et al., 2005). La cinética temporal de la proteína *Arc/Arg 3.1* mostró que su pico máximo de

expresión ocurre a los 30 minutos después del evento conductual, y que retorna a los niveles basales a las 3 horas (Fig. 5a). Sin embargo, existe una segunda ola de expresión a las 8 horas posteriores al evento conductual, la cual probablemente se origina por medio de un mecanismo de reactivación molecular fuera de línea. Adicionalmente se observó que todas las neuronas que expresaron el ARNm de *ARC/Arg 3.1*, lo traducen a su producto proteico (Fig. 5b). El porcentaje de las neuronas activadas por la experiencia fue diferente en cada estructura, por ejemplo en el área de CA1 se activó el 35%, mientras que en el área de CA3 y en la corteza parietal, el porcentaje de neuronas activas fue del 20 y 50% respectivamente.

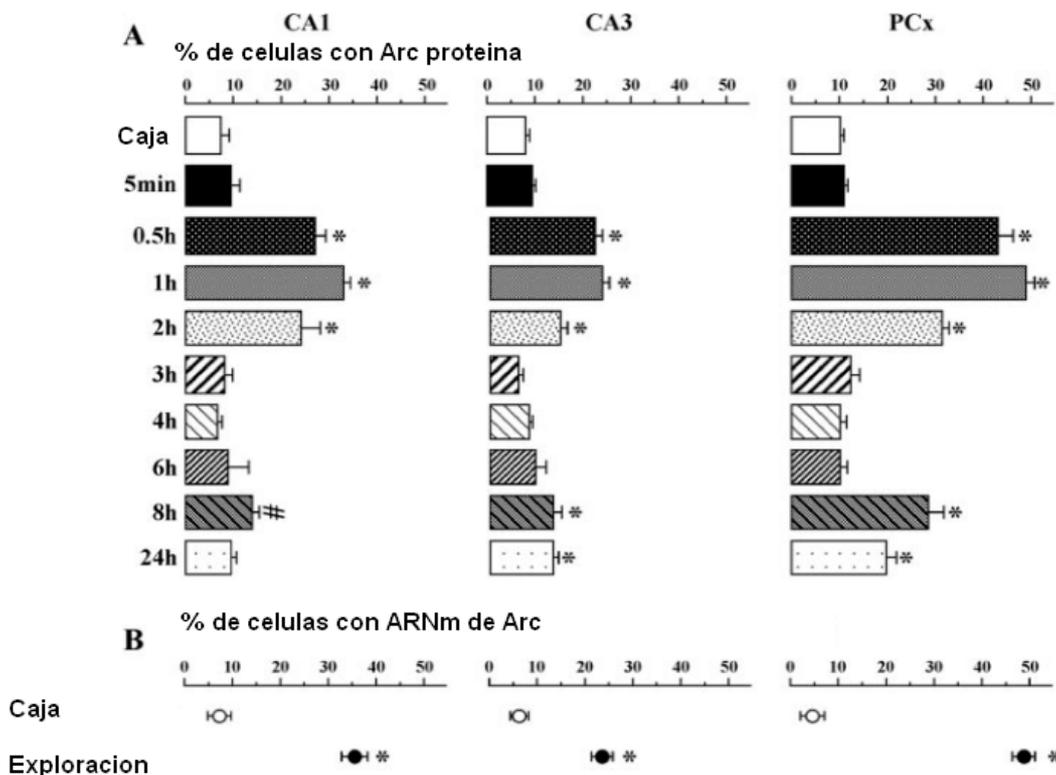


Fig. 5. Expresión de *Arc/Arg 3.1* en CA1, CA3 y Corteza Parietal. Dinámica de la expresión de *Arc/Arg 3.1* inducida por la exploración A).- Porcentaje de las neuronas que expresan la proteína *Arc/Arg 3.1* (correspondiente a la primera exploración), B).- Porcentaje de las neuronas que expresan el ARNm de *Arc/Arg 3.1* (correspondientes a la segunda exploración). (Ramírez-Amaya et al., 2005).

Al analizar las propiedades de respuesta de las neuronas del giro dentado, se encontró que el ARNm de *Arc/Arg 3.1* se mantiene transcribiendo (Fig 6b) y traduciendo a proteína (Fig 6a) hasta por un período de ocho horas posteriores al evento conductual. De manera interesante, esta respuesta solo

se presentó en la hoja superior (UB) del giro dentado, ya que en la hoja inferior (LB) solo se mostró un incremento en la proporción de neuronas que expresan la proteína Arc/Arg 3.1 y el ARNm de Arc/Arg 3.1, a las 6 horas después de la exploración (Ramírez-amaya et al., 2005).

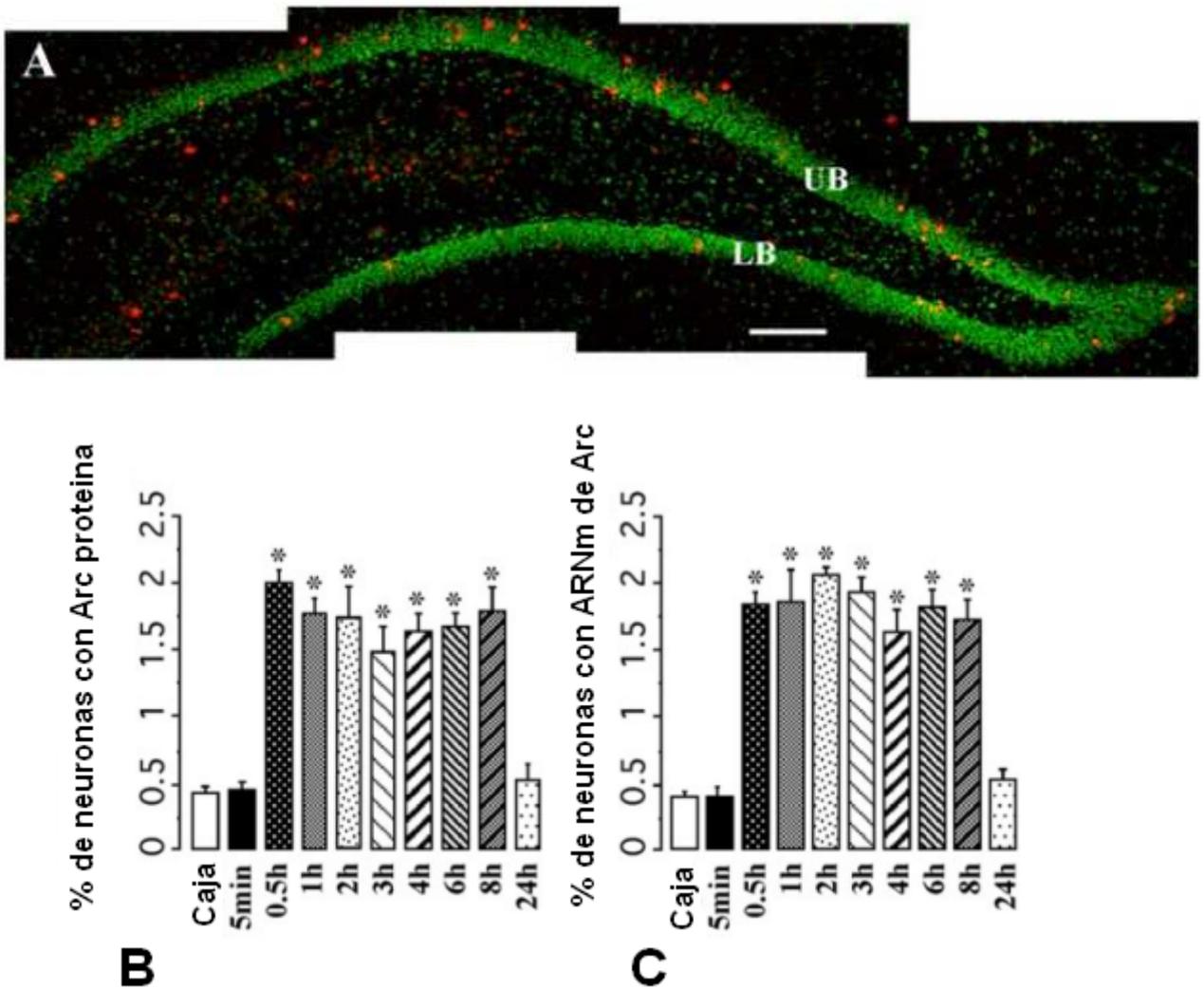


Figura 6.- Expresión de Arc/Arg 3.1 en el giro dentado asociada a la exploración. En la imagen superior se puede apreciar en rojo las células que expresan Arc/Arg 3.1 después de la exploración, en verde la tinción nuclear con SYTOX. Como se puede observar en la grafica de barras, en la hoja dorsal (UB) del Giro Dentado, la proteína y ARNm de Arc/Arg 3.1 esta presente en aproximadamente el 2% de las células granulares desde 30 minutos después de la exploración, y la proporción de células que expresan Arc/Arg 3.1 se mantiene significativamente elevada con respecto a los controles hasta 8 horas después de la exploración, regresando a niveles basales a las 24 horas. *p<0.01. Datos pertenecientes a la hoja dorsal del giro dentado. La barra blanca en la imagen representa 100µm. (Ramírez-Amaya, et al., 2005)

Cuando se trata de observar el curso temporal del ARNm de Arc/Arg 3.1 en el giro dentado, no se puede distinguir claramente entre el ARNm de Arc/Arg 3.1

nuclear y el ARNm de *Arc/Arg 3.1* citoplasmático (debido a que la tinción citoplasmática es demasiado intensa y no permite diferenciarla de la expresión de *Arc* nuclear). Como no se conoce el origen del ARNm de *Arc*, no es posible demostrar que la expresión sostenida de *Arc* sea el producto de una transcripción constante o de algún otro mecanismo de regulación posterior a la transcripción, por ejemplo de la liberación del ARNm de *Arc/Arg 3.1* que podría estar almacenado en vesículas.

El conocer el origen del ARNm de *Arc* es de vital importancia, porque al comprobar la existencia del proceso de transcripción sostenida de este gen, se demostraría la existencia de un mecanismo de mantenimiento de actividad molecular fuera de línea, que probablemente estaría implicado en los procesos de refinamiento sináptico necesario para la formación de la memoria de largo plazo. A nivel conductual, la formación de una memoria de largo plazo necesita de un proceso de consolidación dependiente del tiempo (McGaugh, 2000), dentro del cual, se piensa que existe un proceso de refinamiento en las conexiones sinápticas (Lamprecht y LeDoux, 2004).

Para probar la existencia de un mecanismo de mantenimiento de actividad molecular fuera de línea, Angulo-Perkins et al., implementaron una técnica que permite corroborar si la expresión del ARNm de *Arc/Arg 3.1* se debe a un proceso de transcripción sostenida o a un mecanismo de control postranscripcional. Este método se basó en la detección del ARN intrónico como marcador de la actividad transcripcional y del ARNm de *Arc/Arg 3.1* que se detecta en el citoplasma y/o en el núcleo. La prueba experimental consistió en sacrificar a los animales en 8 puntos temporales después de la exploración de un ambiente novedoso (0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 horas). Cuando se analizó el porcentaje de células que expresaron el ARN de *Arc/Arg 3.1* nuclear (intrónico) y el ARNm de *Arc/Arg 3.1* (citoplasmático), se encontró que del total de las neuronas que expresaron ARN de *Arc/Arg 3.1* (2% de la población) desde 0.5 hasta las 8 horas, aproximadamente el 25% es nuclear, el 25% es citoplasmático y cerca del 50% lo expresaron tanto en el núcleo como en el citoplasma (resultados preliminares). Estos resultados sugieren que por lo menos en el 75% de las neuronas se encuentra activa la maquinaria de transcripción para inducir la expresión del ARNm de *Arc/Arg 3.1* hasta 8 horas

después del evento conductual. Esto apoya a la idea de que ocurren eventos moleculares fuera de línea asociados con la plasticidad que podrían subyacer a la consolidación de la memoria.

Sin embargo, para conocer cómo los procesos de activación de *Arc/Arg 3.1* fuera de línea pueden contribuir a la formación de la memoria en el largo plazo es necesario conocer cual es el papel de *Arc/Arg 3.1* en los procesos de la memoria y el aprendizaje, así cómo la participación del giro dentado en la consolidación de las memorias dependientes del hipocampo.

A nivel conductual se ha observado que *Arc/Arg 3.1* es indispensable para la ejecución exitosa de las pruebas de memoria. McIntyre et al. (2005) demostraron que la aplicación intrahipocampal de un oligodeoxinucleotido antisentido para el ARNm de *Arc/Arg 3.1* (que impide su traducción a proteína), produce deficiencias en la retención de la información en la prueba de evitación inhibitoria.

En otros experimentos, en los cuales se investigó el papel del gen *Arc/Arg 3.1* en los procesos de la plasticidad sináptica y la memoria a través del uso de ratones knockout para *Arc/Arg 3.1*. Se encontró que los animales knockout presentaron deficiencias en todas las tareas de memoria analizadas, aunque dependían de substratos neuronales diferentes. Por ejemplo, en la tarea de memoria espacial dependiente del hipocampo (aprendizaje de lugar en el laberinto acuático de Morris), los animales knockout presentaron deficiencias en la adquisición y la consolidación de la memoria en la fase de inversión (etapa de la prueba de aprendizaje relacionada con el manejo flexible de la información espacial). Por lo tanto, los animales mostraron deficiencias en la adquisición y el mantenimiento de la información espacial que se maneja flexiblemente (Plath et al., 2006). Las pruebas de memoria no dependientes del hipocampo también fueron afectadas, ya que en la tarea de memoria de aversión al sabor condicionado, los animales knockout no fueron capaces de formar una memoria de aversión a un nuevo sabor. Estos resultados sugieren que los mecanismos moleculares reclutados para la formación de las memorias son semejantes en las diferentes regiones cerebrales, y que *Arc* juega un papel preponderante en estos mecanismos.

A nivel celular, se ha sugerido que para que Arc/Arg 3.1 pueda establecer su función en los procesos de la plasticidad sináptica se necesita una expresión sostenida dentro de las regiones sinápticas activas. Evidencia a favor de que Arc/Arg 3.1 necesita de una expresión sostenida para establecer su función se encontró en trabajos donde demostró que el mantenimiento de la PLP requiere de una expresión continua de la proteína Arc/Arg 3.1 dentro de un periodo de 2 a 4 horas posterior a su inducción (Messaoudi et al., 2007). Debido a que una experiencia conductual novedosa induce la expresión sostenida del RNAm de Arc/Arg 3.1 y de la proteína de Arc/Arg 3.1, y a que la expresión sostenida de Arc es necesaria para el mantenimiento de la PLP, es probable que la expresión sostenida inducida conductualmente actúe como un mecanismo molecular necesario para la estabilización de los cambios plásticos generados por la experiencia conductual.

2.2.- Modelos y evidencia experimental acerca del papel del giro dentado en los procesos de la memoria y el aprendizaje

El hipocampo es una estructura crítica para adquirir, almacenar y recuperar las representaciones de la memoria. El modelo acerca de la función hipocampal que explica el mecanismo de codificación de la información sugiere que el circuito recurrente del área de CA3 es capaz de asociar y almacenar de forma simple un nuevo patrón de memoria con base en la modificación de sus conexiones sinápticas (Marr, 1971). Sin embargo el área de CA3 también es importante para la detección de novedad asociativa (proceso que permite identificar cambios en la configuración espacial o temporal de una experiencia), la importancia biológica de este fenómeno es la de actualizar el conocimiento acerca del entorno y la forma en que este cambia. Los modelos teóricos tratan de explicar mecanísticamente como el hipocampo participa en la detección de novedad asociativa, sugieren que la región de CA3 desempeña la función de un comparador, esta función le permite al sistema detectar la diferencia entre las representaciones de memoria almacenadas en la red autoasociativa del área de CA3 de los nuevos patrones provenientes de la experiencia actual (Treves y Rolls, 1992).

Los mecanismos encargados de la codificación de las nuevas experiencias y de la detección de novedad requieren de un proceso operacional que les permita detectar e integrar eficientemente la información novedosa dentro del área de CA3. De lo contrario la propiedad autoasociativa de esta región, puede generar interferencia para la codificación de los nuevos trazos de memoria, debido a que los patrones de actividad originados por una experiencia similar que ha sido previamente almacenada, podrían evocar la representación del episodio almacenado (interfiriendo con la codificación del nuevo episodio). Como consecuencia, el sujeto no podría identificar la diferencia entre la representación de dos trazos de memoria que sean muy semejantes (Kesner et al., 2004; Lee et al., 2005; Rolls y Kesner, 2006).

Para evitar la interferencia entre trazos de memoria similares, el área de CA3 necesita un sistema que le permita detectar como diferentes, los trazos de memoria que sean semejantes. Se ha sugerido que el giro dentado, una estructura de relevo que proyecta al área de CA3 participa en esta tarea mediante el proceso de separación de patrones. Proceso que le permite al sistema detectar las diferencias entre los patrones de entrada similares. Una propiedad computacional útil para este proceso es la ortogonalización (proceso que elimina a los patrones de entrada redundantes), la cual permite amplificar los patrones de entrada que sean diferentes para la generación de representaciones escasas y discretas (Rolls, 1996; Rolls y Kesner, 2006; Treves y Rolls, 1994). En el giro dentado la separación de patrones por medio de la ortogonalización es facilitada por la activación escasa de las neuronas (estas presentan una baja probabilidad de activación) y una conexión puntual (baja probabilidad de que una neurona del giro dentado conecte a dos neuronas del área de CA3), por lo tanto la salida del giro dentado es escasa y ortogonal (durante la representación de eventos semejantes, el giro dentado transmite al área de CA3 solo los patrones de salida diferentes).

Con base en la localización cercana al soma y al fuerte efecto excitatorio de las neuronas granulares del giro dentado sobre las neuronales principales del área de CA3 (Henze et al., 2002), se ha sugerido que durante la codificación de un evento novedoso, el giro dentado es capaz de generar un nuevo patrón de actividad dentro del circuito recurrente del área de CA3 (Rolls y Kesner, 2006).

A nivel conductual también se ha observado que el giro dentado es necesario para la detección de la novedad (Lee et al., 2005) y la codificación inicial de la información espacial (Lassalle et al., 2000; Lee y Kesner, 2004).

La evidencia experimental muestra que cuando se evalúa la memoria en animales con lesión del giro dentado, éstos presentan deficiencias en la ejecución de las tareas dependientes del hipocampo (memoria espacial), principalmente en la etapa de adquisición. La tarea consistió en encontrar una plataforma oculta por medio del uso de señales del espacio externas al laberinto (laberinto acuático de Morris). Cuando se evaluó la memoria de trabajo en el laberinto acuático de Morris (la plataforma oculta fue movida de lugar en cada bloque de cuatro ensayos, y los animales tomaban como referencia el primer ensayo para ubicar la plataforma en los subsecuentes ensayos), los animales con lesión en el giro dentado, mostraron profundas deficiencias en la ejecución de la tarea. Con base en estos resultados el autor propuso que el giro dentado es una estructura esencial para la adquisición y el manejo flexible de la información espacial (Xavier et al., 1999).

Adicionalmente McNaughton (1989) realizó un trabajo experimental donde encontró que la lesión del giro dentado por medio de Colchicina, generó deficiencias en la ejecución de tareas de memoria espacial sin afectar la capacidad de generar los campos de lugar en las neuronas hipocámpales de las áreas de CA3 y CA1, pero si disminuyó la estabilidad de los campos de lugar. Estos resultados sugieren que la información espacial que arriba a los cuernos de Ammon puede provenir directamente de la corteza y que la información espacial que recibe el giro dentado no es vital para el establecimiento de los campos de lugar. Sin embargo, las deficiencias generadas tras la lesión del giro dentado, nos sugiere que la información espacial procesada por el giro dentado es importante para que se establezca de forma eficiente la codificación de información espacial conductualmente relevante (McNaughton et al., 1989). Por lo tanto, esta evidencia sugiere que el giro dentado es importante para el uso de la información espacial en la memoria.

En otro grupo de experimentos se encontró que los animales con lesión del giro dentado, presentaron dificultad en la capacidad de detección de la novedad espacial durante la ejecución de una tarea de reconocimiento de objetos. En una primera etapa la tarea consistió en someter a los animales a la exploración de un ambiente que presentaba una configuración específica de cinco objetos, y en la segunda etapa se cambió la configuración espacial de dos objetos. Los animales con lesión del giro dentado no fueron capaces de detectar la nueva configuración espacial (medida por el tiempo de reexploración de los objetos movidos) (Lee et al, 2005).

De éste modo es claro que el giro dentado es necesario para el procesamiento de información novedosa, debido a que la lesión del giro dentado produce deficiencias en la etapa de adquisición en tareas de memoria, y afecta la capacidad de detectar los cambios que se presentan en la configuración del espacio.

3a.- JUSTIFICACIÓN (A)

El interés de este trabajo en una primera instancia se centró en la determinación de la relevancia funcional de la expresión sostenida de Arc/Arg 3.1 en el giro dentado. Debido a que el giro dentado juega un papel importante en la codificación de las nuevas memorias, en este estudio se pretendió establecer si existe una relación entre la dinámica de la expresión sostenida de Arc/Arg 3.1 y una de las funciones primordiales del giro dentado que es la codificación de la información novedosa.

Evidencia previa mostró que la expresión sostenida de Arc/Arg 3.1 se presenta después de la exploración de un ambiente novedoso, condición en la que se codifica y representa la información novedosa. Sin embargo, no se ha estudiado si este fenómeno ocurre durante el manejo de información familiar. Adicionalmente se ha demostrado que expresión de la proteína Arc/Arg 3.1 es necesaria para la consolidación de la plasticidad sináptica y la memoria. Por lo cual, la expresión sostenida de Arc/Arg 3.1 en el giro dentado puede ser parte de los procesos plásticos asociados al procesamiento de una nueva memoria.

En este contexto, la pregunta de este trabajo es ¿La expresión sostenida de Arc/Arg 3.1 en el giro dentado se asocia a la función del giro dentado que involucra el procesamiento de la información novedosa?

Para contestar esa pregunta se utilizaron pruebas conductuales que involucran el manejo de la información novedosa y familiar. Lo anterior para determinar si estas condiciones conductuales afectan a la dinámica de la expresión sostenida de Arc/Arg 3.1 en el giro dentado. La estrategia experimental consistió en analizar a la cinética temporal de expresión de Arc (1, 8 y 24 horas) después de la exploración de un ambiente novedoso y de la exposición a un ambiente familiar. La exposición al ambiente familiar correspondió a la representación de una memoria ya consolidada, mientras que la exploración del ambiente novedoso a la representación de una nueva memoria.

2.3.- Interacción entre las redes neuronales a través del análisis de la actividad de campo local

Uno de los retos actuales en el área de las neurociencias se centra en la comprensión de los principios que rigen la forma en la cual se procesa la información en el cerebro. Una visión clásica acerca de estos principios, supone que la transferencia de la información de una región a otra pasa de manera unidireccional y pasiva. Esto significa que la estructura denominada como la fuente es la encargada de controlar cual es la información que va a recibir la estructura blanco. Sin embargo, actualmente se considera que la estructura blanco juega un papel activo en la coordinación de la ventana temporal en la cual esta estructura puede ser más receptiva para iniciar la lectura de la información que recibe de la estructura fuente (Sirota y Buzsaki, 2005). De esta manera, es importante que exista una coordinación precisa entre la estructura que envía y la estructura que recibe la información.

Una forma de coordinar grupos neuronales distribuidos que están intercambiando información, puede ser a través de la sincronización de la actividad oscilatoria de estos grupos (Buzsaki y Draguhn, 2004). La actividad oscilatoria es el producto de la actividad coordinada entre las neuronas de una población, por lo tanto, una forma de observar la sincronización de las redes

neuronales distribuidas es mediante el análisis de la actividad oscilatoria (Basar, 2004).

2.4.- Origen de la actividad oscilatoria de campo local en el hipocampo

La generación de la actividad oscilatoria es una característica de la mayoría de las regiones cerebrales, esta se originan por medio de la actividad intrínseca de la propia red y por las influencias extrínsecas. La actividad oscilatoria se ha asociado a las diferentes funciones cognitivas como la atención, la memoria y el aprendizaje, así como a los estados de sueño y vigilia, y al procesamiento de la información sensorial (Buzsaki, 2006).

En el hipocampo se han observado dos patrones de actividad oscilatoria rítmica, la actividad theta y el patrón LIA (actividad irregular de gran amplitud), los cuales son mutuamente excluyentes debido a que se presentan en estados conductuales diferentes. La actividad oscilatoria rítmica de frecuencia theta (4-12 Hz) se presenta en el sueño MOR y durante la ejecución de conductas relacionadas con la extracción de información del ambiente, cómo es el caso de la conducta exploratoria, el olfateo, la postura de erguida, y las respuestas de orientación, entre otras (Buzsaki et al., 1983).

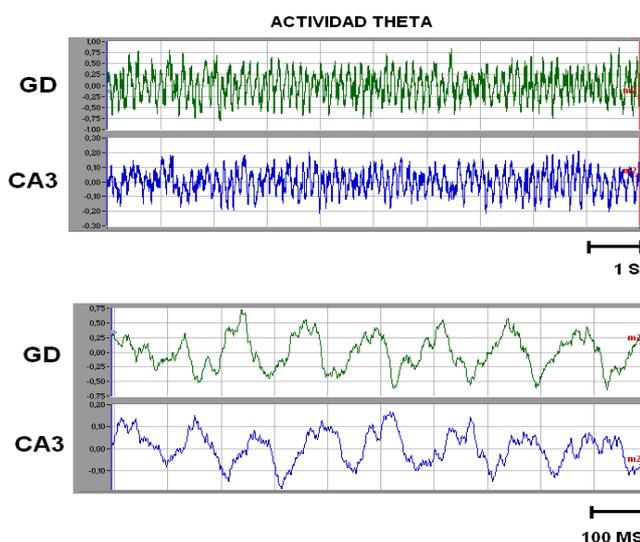


Figura 7.- Actividad theta hipocampal. En los trazos superiores se aprecia lo estable de la actividad theta en las áreas de giro dentado y CA3 registrada durante la conducta exploratoria (muestra de 10 segundos). Los trazos inferiores corresponden a una amplificación de la señal superior donde se aprecia un constante cambios de fase entre la señal de las dos áreas hipocampales, sugiriendo la existencia de generadores independientes de la actividad theta.

El ritmo theta hipocampal ha sido ampliamente correlacionado con los procesos de la memoria y el aprendizaje (Olvera-cortés et al., 2002; Olvera-Cortés et al.,

2004; Hasselmo, 2005). La lesión o inactivación del septo medial (la principal entrada subcortical al hipocampo) produce la eliminación del ritmo theta hipocampal y genera severas deficiencias la ejecución de tareas de memoria dependientes del hipocampo (Winson, 1978). Estos resultados sugieren que el ritmo theta hipocampal juega un papel importante en los procesos de la memoria y el aprendizaje.

Desde 1962 Petsche y colaboradores propusieron que el complejo septo medial-limite vertical de la banda diagonal de broca (SM/LVBDB) funciona como un marcapasos que controla el ritmo theta hipocampal (Petsche et al., 1962). A favor de esta propuesta, se ha observado en trabajos mas recientes que un amplio porcentaje de las neuronas del septo medial disparan en relación a la frecuencia theta hipocampal (Colom et al., 1991). Por otra parte, la lesión de las neuronas GABAérgicas septales genera una fuerte repercusión sobre la actividad theta hipocampal producida en animales en libre movimiento, sin embargo, la lesión de las células colinérgicas no afecta el ritmo theta producido durante el movimiento (Yoder y Pang, 2005; Lee et al., 1994).

Adicionalmente, se ha observado que la aplicación local de agonistas muscarínicos como Carbacol sobre las rebanadas del hipocampo que presentan a la región de CA3 intacta, produce actividad oscilatoria de frecuencia theta (Bland et al., 1988). Posteriormente Kocsis et al. (1999), demostraron que el hipocampo mismo es capaz de producir actividad oscilatoria (actuando como un generador de corriente theta independiente de las entradas externas) mediante mecanismos intrínsecos de la red, que dependen de la activación de las colaterales recurrentes del área de CA3, de las interneuronas asociadas, y de la acción permisiva de la entrada colinérgica septal (Kocsis et al., 1999; Buzsaki, 2002). Estos trabajos demuestran la importancia que tiene la entrada septal al hipocampo en la generación de la actividad theta, sin embargo, el mecanismo por el cual estas neuronas contribuyen a la generación del ritmo theta hipocampal aun es elusivo (Buzsaki, 2006).

2.5.- Sincronización de las poblaciones neuronales a través de la actividad oscilatoria de campo local

Para estudiar el papel de la actividad theta es indispensables conocer algunas de sus propiedades. Por ejemplo, se ha observado que diferentes agentes farmacológicos incrementan o disminuyen la potencia de un rango discreto de las frecuencias de la actividad theta, por lo cual se ha propuesto la existencia de diferentes sub-bandas de la actividad theta. Estudios tempranos mostraron que existe una banda de la actividad theta que va de 4-7 Hz, la cual es dependiente de actividad colinérgica, además de una banda de frecuencia theta de 6-9 Hz la cual no depende de la acetilcolina (Vanderwolf y Baker, 1986; Vanderwolf, 1988). Adicionalmente se ha postulado la existencia de otra banda de frecuencia theta de 5-12 Hz dependiente de la actividad exploratoria del animal (Vinogradova, 1995).

Durante el estado de vigilia, se ha observado que la actividad theta se asocia con la extracción activa de la información ambiental (Vinogradova, 1995). En un estudio posterior se dividió a la actividad theta (4-12Hz) en tres bandas de frecuencia: de baja (4-6.5 Hz), de alta (6.5-9.5 Hz), y de máxima (9.5-12 Hz). Lo anterior con el objetivo de evaluar si los patrones de la actividad theta (establecidos de acuerdo a la división generada por el perfil neuroquímico) sufren cambios debido al procesamiento de la información dependiente de la función hipocampal (Olvera-Cortés et al., 2002).

Cuando se realizó el análisis de la potencia de la actividad theta registrada en el área hipocampal de CA1, se encontró un aumento en la potencia relativa de la banda theta de alta frecuencia (6.5-9.5 Hz) y una disminución en la potencia de la banda theta de baja frecuencia (4-6.5Hz) subyacente al aprendizaje de lugar (dependiente del procesamiento de información hipocampal). Sin embargo, en las pruebas no dependientes del hipocampo, como el aprendizaje de señal (que constituye un tipo de asociación estímulo-respuesta en la que no participa el hipocampo) no se observó esta separación de bandas, por lo cual se sugirió que los cambios en la potencia relativa de la actividad theta se relacionan a la función hipocampal (Olvera-Cortés et al.,

2002). Adicionalmente, se encontró un aumento en el porcentaje de la actividad theta cuando los animales aprendieron a ejecutar correctamente la tarea (Olvera-Cortes et al., 2004).

Debido a que la fase de la actividad theta cambia a medida que un electródo de registro avanza en el eje dorsoventral del hipocampo, se ha sugerido la presencia de varios generadores de la corriente theta. En base a esta propuesta, se realizó un trabajo para determinar si existían cambios en la actividad theta asociados al aprendizaje en las otras regiones hipocampales. Para lo cual, se registró y analizó la actividad theta generada en el giro dentado durante la ejecución de la tarea del laberinto acuático de Morris. Los resultados experimentales mostraron una relación entre el aprendizaje y los cambios en la actividad theta, ya que se encontró un aumento en la potencia de la actividad theta de alta frecuencia en la fase de aprendizaje de la tarea (resultados preliminares).

Adicionalmente se ha demostrado que durante la ejecución de una tarea de alternancia espacial con retraso dependiente del hipocampo se generan cambios en la potencia y la coherencia de la actividad theta en cada una de las tres regiones hipocampales. En este trabajo se demostró que cuando el animal viajaba por el brazo central del laberinto (antes de elegir el brazo de destino) se presentaba un aumento en la coherencia de la actividad del giro dentado con la actividad de las regiones hipocampales de CA3 y CA1, a la par con un aumento en la amplitud de la actividad theta en la región de CA1. Por lo cual, los autores sugirieron que la sincronización entre las regiones del hipocampo a través de la actividad theta se asocia con el procesamiento de información hipocampal (Montgomery et al., 2009).

Sin embargo, en un grupo de tareas de exploración consideradas como control, debido a que su ejecución no depende de la integridad del hipocampo, también se encontraron estos cambios. Lo cual indica que los cambios en la actividad theta son inducidos por el procesamiento de la información espacial y no exclusivamente por la información espacial relacionada a una tarea de aprendizaje asociativo (Montgomery et al., 2009; Shirvalkar y Bahar, 2009).

Estudios recientes mostraron que en la region del giro dentado se incrementa la amplitud y la coherencia de la actividad theta en la fase de sueño MOR en comparación a la actividad theta originada en estado despierto. Mientras que en la region de CA1 la actividad theta de mayor amplitud se generó en el estado de vigilia, esta evidencia sugiere que existen “cambios dependientes de estado” en la coordinación de las regiones del hipocampo (Montgomery et al, 2008). En la fase de sueño MOR se incrementó la sincronía de la actividad theta y gama entre las regiones de CA3 y del giro dentado, por el contrario, el poder de la actividad gama entre las regiones de CA3-CA1 disminuye drásticamente en comparación con el estado de vigilia.

Consistente con el aumento en la amplitud y la coherencia en la red del giro dentado en la fase sueño MOR, se ha observado que la expresión de genes de inducción temprana como *zif-268* (activados por estimulación de alta frecuencia o por una experiencia conductual), son reactivados específicamente en ésta fase del sueño (Ribeiro et al, 1999; Ribeiro et al., 2002). Por otro lado, se ha obtenido evidencia experimental que muestra que la lesión del septo que produce la eliminación del ritmo theta hipocámpal, bloquea la expresión de *Arc/Arc 3.1* inducida por la conducta (Fletcher et al., 2006). Esta evidencia sugiere que puede existir relación estrecha entre la expresión de genes de inducción temprana con el patrón de actividad oscilatoria de frecuencia theta.

También se ha demostrado que la coordinación de redes neurales a través de la actividad theta favorece los cambios en la plasticidad sináptica. Por ejemplo, se ha observado que la estimulación de alta frecuencia en la fase positiva de la actividad theta induce la PLP, mientras que la estimulación de alta frecuencia que se aplica en la fase negativa de la actividad theta genera una depresión de largo plazo (DLP) (Buzsáki y Draguhn, 2004; Orr et al., 2001).

Esta evidencia experimental demuestra que los procesos de la plasticidad sináptica y la expresión de genes de inducción temprana son beneficiados por la presencia de los patrones de actividad oscilatoria de frecuencia theta.

3b.- JUSTIFICACIÓN (B)

Se ha observado que el manejo de la información novedosa es capaz de generar olas de reactivación de los genes de expresión temprana *zif268* y *Arc/Arg 3.1* en la fase de sueño MOR, fase del sueño que se caracteriza por la presencia de actividad oscilatoria de frecuencia theta en el hipocampo (Ribeiro et al., 2007). Se ha sugerido que esta reactivación subyace a los procesos de reactivación molecular necesarios para la consolidación de las nuevas memorias (Ribeiro et al., 1999; Ribeiro et al., 2002; Ribeiro et al., 2004; Ribeiro et al., 2007).

Debido el patrón de la actividad theta en el área hipocampal es importante para la expresión de genes durante la codificación de una experiencia conductual y para la formación de la memoria, es probable la actividad theta generada en la fase del sueño MOR participe en la reactivación de los genes de expresión temprana y favorezca la consolidación de las nuevas memorias.

En una segunda instancia, este trabajo se enfocó en la identificación de los mecanismos fisiológicos que puedan subyacer al fenómeno de la transcripción sostenida. Para lo cual se analizó el patrón de la actividad oscilatoria de la red del giro dentado con la finalidad de determinar si existen cambios en la actividad oscilatoria de la red que se asocien con el fenómeno de la expresión sostenida de *Arc/Arg 3.1* en el giro dentado.

La estrategia experimental consistió en analizar el patrón de la actividad theta registrada en las áreas hipocampales de giro dentado y CA3 en las mismas ventanas temporales en las que se estudió la expresión de *Arc/Arg 3.1* después de la exposición a un ambiente novedoso y a un ambiente familiar.

4.- HIPÓTESIS

- La expresión sostenida de Arc/Arg 3.1 será inducida por la exposición a un ambiente novedoso y no por la exposición a un ambiente familiar.
- La expresión de la proteína Arc/Arg 3.1 se asociará con cambios en el patrón de la actividad oscilatoria del giro dentado y de CA3, después de la exposición a un ambiente novedoso o familiar.

5.- OBJETIVOS

- Determinar si se induce y mantiene de forma sostenida la expresión de la proteína Arc/Arg 3.1 después de la exposición a un ambiente familiar.
- Determinar si la expresión sostenida de Arc/Arg 3.1 inducida por la exploración de un ambiente novedoso se correlaciona con cambios en la actividad theta en el giro dentado.
- Determinar si existen cambios en el patrón de actividad oscilatoria registrada en el área de CA3 después de la exposición a un ambiente novedoso o familiar.

6.- MATERIAL Y MÉTODOS

6.1.- Lote Experimental

Se utilizaron 33 ratas macho de la cepa Sprague Dawley de 300 a 400 g de peso mantenidas bajo condiciones estándar de bioterio, 28 ratas con un ciclo de luz-obscuridad invertido de 12 por 12 horas y 5 ratas con un ciclo de luz-obscuridad normal. En ambos casos las pruebas conductuales se realizaron en la fase de actividad del animal. Los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales del laboratorio y con la guía de los Institutos de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica (NIH) para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Publicación NIH No.80-23, 1996). El protocolo de investigación fue aprobado por el comité de ética e investigación del Instituto Mexicano del Seguro Social, México. Se tomaron las medidas adecuadas para reducir al mínimo el dolor o sufrimiento de los animales.

Los animales fueron incluidos en dos grupos experimentales:

El primer grupo constituido por cinco animales se utilizó en los experimentos de registro de la actividad oscilatoria, con éste fin se les realizó un implante crónico de dos electrodos de registro bipolar y uno monopolar. Los electrodos bipolares se utilizaron para el análisis de la actividad oscilatoria y fueron colocados en el hipocampo, uno dentro del estrato granular del área del giro dentado, y el otro en el estrato lucidum del área de CA3. El electrodo monopolar se colocó en la corteza somatosensorial y se utilizó para monitorear en línea los estados de sueño. Los animales tuvieron un periodo de recuperación de 15 días antes de realizar las evaluaciones conductuales.

6.2.- Procedimiento Quirúrgico

Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (25 mg/kg), aplicado intraperitonealmente para proceder al implante de los electrodos bipolares concéntricos. El primer electrodo se colocó en estrato granular del giro dentado, cuyas coordenadas son, 3.5 mm antero-posterior a bregma, 1.5 mm lateral a la línea media y 3.4 dorso-ventral a la superficie del cráneo. El

segundo electrodo fue colocado en el estrato lucidum del área del CA3, con coordenadas 3.5 mm antero-posterior a bregma, 3.5 mm lateral a la línea medial y 4.4 dorso-ventral a la superficie del cráneo (Paxinos y Watson 1998).

Los electrodos bipolares fueron construidos con una cánula de acero inoxidable calibre 25 aislada con resina epóxica, estos presentaban una pequeña superficie expuesta en la punta, en el interior de la cánula se fijó un alambre de nicromo de 65 µm. Una vez armado el electrodo, este fue fijado al cráneo con acrílico dental.

6.3.- Evaluaciones Conductuales.

Se utilizó un laberinto de campo abierto de forma cuadrada de 70 x 70 cm y 20 cm de altura. La superficie de la caja de exploración fue dividida en nueve cuadrantes. La tarea conductual consistió en colocar al animal pseudo-aleatoriamente en el centro de cada cuadrante por un tiempo de 15 segundos, de tal manera que cada cuadrante fuera visitado en dos ó tres ocasiones durante el tiempo de exploración que fue de cinco minutos.

6.4.- Registro de la actividad oscilatoria del hipocampo

El registro de la actividad eléctrica fue exclusivo del grupo uno, el cual fue sometido a la exploración de campo abierto por nueve días consecutivos (figura 8). El registro se obtuvo en cinco puntos temporales, el primer registro se realizó antes de la prueba conductual y se le considero basal, mientras que los cuatro puntos de registro restantes se realizaron después de la prueba conductual.

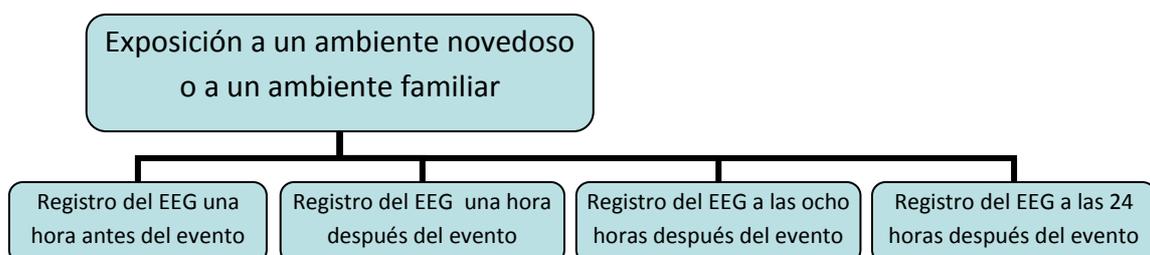


Figura 8.- Diagrama experimental. Periodos de registro asociados a la exposición a un ambiente novedoso o familiar. Electroencefalograma (EEG)

Debido a que el patrón de la actividad oscilatoria cambia en función del estado conductual, la señal registrada se clasificó de acuerdo a cuatro estados conductuales (Atento-quieto, sueño de ondas lentas, sueño de movimientos oculares rápidos (MOR) y conductas motoras (desplazamiento y erguidas). El número de muestras del EEG analizadas en cada ventana temporal dependió de la duración y recurrencia de cada estado conductual. Para el análisis de la fase de sueño de ondas lentas se tomaron entre 50-70 muestras, para el estado de atento-quieto se analizaron entre 5-10 muestras, en la fase de sueño MOR las muestras analizadas fueron 30-50, y para la conducta exploratoria entre 8-15 muestras (cada muestra corresponde a trazos de EEG de un segundo).

El registro de la actividad eléctrica se realizó a través del Neuro Data Acquisition System de GRASS Mod. 12C-4-23. La frecuencia de muestreo de la señal fue de 1024 Hz, y el filtro pasa banda utilizado fue de 1-100 Hz. Los datos de la señal fueron almacenados digitalmente. El espectro de potencia de la señal fue analizado al concluir los ensayos experimentales.

6.5.- Análisis de la actividad oscilatoria de campo local

La actividad de campo se dividió en 3 bandas: theta (4-11 Hz), beta (11-20 Hz y gama (20-50 Hz). Adicionalmente la actividad theta se dividió en tres sub-bandas: baja (4-6 Hz), alta (6-8 Hz), y máxima (8-11 Hz) frecuencia. El análisis del espectro de las potencias se realizó mediante el programa Potencor (Guevara et al., 2003).

Este análisis tiene el propósito de conocer si la conducta exploratoria genero cambios en la potencia de las bandas de la actividad oscilatoria y si estos se relacionan con el fenómeno de la expresión sostenida de Arc/Arg 3.1.

Para determinar si existen cambios en la actividad eléctrica asociados a la expresión de Arc después de la exposición de un ambiente novedoso o de un ambiente familiar, se realizó una comparación de la actividad eléctrica obtenida en las mismas ventanas temporales utilizadas para el estudio la expresión de Arc/Arg 3.1 en cada condición conductual. Para lo cual se comparó el espectro

de la potencia relativa de cada banda de actividad oscilatoria de la condición de novedad contra la condición de familiaridad.

Finalmente se verificó la posición de los electrodos por medio de la técnica de tinción histológica de violeta de cresilo, y solo se analizaron los datos obtenidos de los sujetos que presentaron una posición correcta de implante de los electrodos en las áreas de CA3 y del giro dentado.

6.6.- Expresión sostenida de Arc/Arg 3.1

El segundo grupo fue utilizado para el procedimiento inmunohistoquímico y estuvo compuesto de 28 animales, los cuales fueron manipulados durante 8 días consecutivos antes del inicio de las pruebas conductuales con el propósito habituarlos al contacto humano para evitar efectos relacionados al estrés.

Este grupo se dividió en dos en sub-grupos de 14 animales cada uno, el primer sub-grupo fue sometido a la exploración del ambiente novedoso, mientras que el segundo sub-grupo a la exposición de un ambiente familiar, a través de la presentación continua al mismo ambiente durante nueve días (campo abierto) antes del sacrificio.

El sacrificio de estos animales se realizó por medio de la decapitación, los cerebros fueron rápidamente extraídos y congelados en una solución de 2-methyl-butano, la cual fue enfriada mediante un baño en alcohol etílico y hielo seco.

6.7.1.- Histología

Los cerebros fueron seccionados gruesamente mediante el uso de una matriz de sección, posteriormente se seleccionó la rebanada de todo el hemisferio izquierdo desde la mitad del fórnix hasta el final de la corteza entorrinal. En un molde de plástico se colocó el hemicerebro de un animal por condición para conformar un bloque que fue cubierto con "Tissue tek OCT®" para generar un bloque sólido. Mediante el uso de un criostato se obtuvieron rebanadas de tejido de un grosor 20 μm , las cuales fueron montadas a la laminilla directamente (Fig. 9 y 10). De esta manera cada laminilla contuvo a un

individuo de cada condición experimental. Cada bloque formado contuvo siete hemiserebros, en total se formaron cuatro bloques. Los tejidos montados en las laminillas fueron secados y congelados a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que se efectuó el procedimiento histológico. Para el análisis inmunohistoquímico se utilizaron hemiserebros izquierdos figura (Fig. 10).



Figura 9. Bloqueo. Izquierda- corte de un bloque que contiene al hipocampo, central- hemiserebros izquierdos montados en un bloque, derecha- hemiserebros bloqueados con *Tissue Tek*.

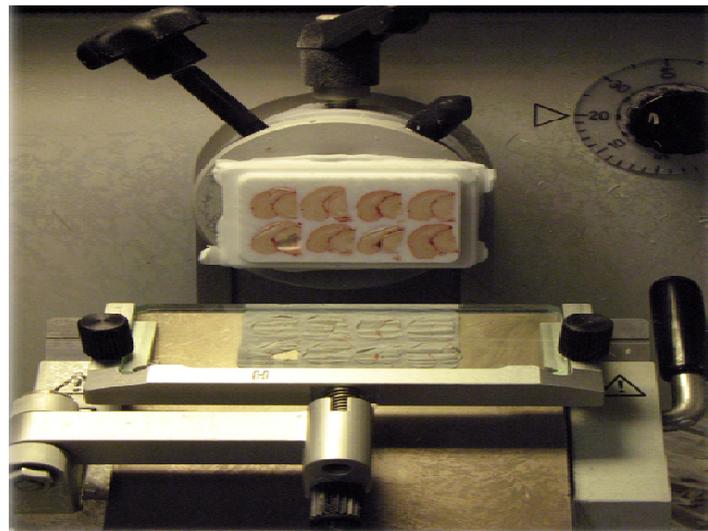


Figura 10.- Cortes de cerebro. Mediante la utilización de un criostato, se cortaron las rebanas de cerebro de 20 micras de grosor, las cuales fueron montadas en un portaobjetos.

6.7.2- Inmunohistoquímica

Los tejidos fueron sometieron a técnica inmunohistoquímica para detectar la proteína de Arc/Arg 3.1.

Se tomaron 5 laminillas de cada bloque, las cuales contienen la parte dorsal del hipocampo (Coordenadas antero-posteriores 7.20mm a 1.36 mm a partir de la

línea interaural). El tejido fue fijado en paraformaldehído al 2% pH 7.4 por 5 minutos, se lavó en TBS pH 7.0. Se bloqueó la acción de la peroxidasa con H₂O₂ al 2 % disuelto en TBS por 15 minutos.

Se bloqueó con el sistema de amplificación de tiramida (TSA Perkin Elmer). Se incubaron las laminillas con el anticuerpo para ARC 1:500 en TSA por 48 horas. Tras el periodo de incubación se lavó el anticuerpo con 2xSSC+Tween 0.05% y se bloqueó con la solución A (kit de Bloqueo) por 15 minutos. Se retiró la solución con lavados en 2xSSC+T y se bloqueó con la solución B (kit de bloqueo). Se lavó nuevamente y se colocó el anticuerpo anti-conejo 1:500 por 2 horas. Nuevamente se volvieron a realizar los lavados para retirar el anticuerpo, mientras se incubaba la solución AB. Pasada media hora se aplicaron 100 µl de la solución AB y se incubaron las laminillas por 45 minutos a temperatura ambiente. Se lava la solución AB, con varios lavados con 2xSSC y se incuba con FitC 1:100 por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó la contratinción con sitox green.

6.7.3.- Microscopía

Se tomaron imágenes de un solo plano, provenientes de tejidos que tienen un grosor de 14-18 µm. Para el análisis de la región hipocámpal del giro dentado las fotos fueron capturadas en modo de mosaico, el tamaño este dependió del tamaño de tal estructura, mediante un objetivo de 25X.

6.7.4.- Análisis de las imágenes:

Las imágenes fueron obtenidas por medio del microscopio Apotome. Para el análisis de estas imágenes se utilizó el programa de Metamorph®, el cual facilita la contabilización de las neuronas que expresaron la proteína de Arc/Arg 3.1. Se midió el área ocupada por el giro dentado y se contabilizó el número de neuronas por área que expresaron Arc/Arg 3.1 dentro de esta estructura.

6.8.- Estadística

Para analizar el efecto de la familiarización sobre la expresión de Arc/Arg 3.1 en el giro dentado se realizó un ANOVA de una vía. La variable independiente fue la condición conductual [Novedad (1,8 y 24 Horas), Familiaridad (1,8 y 24 Horas), control intacto], la variable dependiente fue el porcentaje de las neuronas que expresaron Arc/Arg 3.1 en cada condición experimental. Se realizó una Fisher como prueba pos-hoc para la comparación entre grupos.

Efecto de la familiarización sobre la actividad EEG en las áreas de CA3 y GD. Se realizó un ANOVA de medidas repetidas de tres vías para cada estado conductual (conductas motoras, atento-quieto, sueño de ondas lentas y sueño MOR) en cada una de las regiones hipocampales analizadas.

Las variables independientes fueron, la condición conductual (Novedad, Familiaridad), los periodos de registro (1 hora antes de evento conductual y 1, 8, 24 horas después del evento conductual), y las Bandas de actividad oscilatoria del EEG [beta (11-20 Hz), gama (20-50 Hz), y theta de baja (4-6 Hz), de alta (7-8 Hz), y de máxima (8-11 Hz) frecuencia].

La variable dependiente fue el poder espectral (potencia relativa) de las bandas y sub-bandas de la actividad oscilatoria. Se utilizó la prueba pos-hoc Tukey para realizar las siguientes comparaciones:

La potencia relativa (PR) de cada banda y sub-banda en la condición de novedad Vs. la condición de familiaridad.

La PR de cada banda y sub-banda entre los cuatro periodos de registro durante la condición de novedad y la condición de familiaridad.

7.- RESULTADOS

7.1.- Expresión de Arc/Arg 3.1 en el giro dentado

La exposición a un ambiente familiar o a un ambiente novedoso indujo una fuerte expresión de la proteína de Arc/Arg 3.1 con respecto al grupo control (Fig.11), el ANOVA mostró un efecto significativo para el factor grupo [$F(6,14) = 8.393, P = 0.005$] en el porcentaje de neuronas que expresan Arc/Arg 3.1. Como se había demostrado anteriormente, la exploración de un ambiente novedoso induce un incremento en el porcentaje de neuronas que expresan la proteína Arc/Arg 3.1, en el giro dentado. Sin embargo, en este trabajo se demostró que la exposición a un ambiente familiar también induce la expresión de Arc/Arg 3.1 (Fig. 12). En la figura 11, del lado izquierdo se muestra el giro dentado de un animal que fue control intacto, el cual fue extraído de su caja hogar para realizar el análisis de la expresión de Arc/Arg 3.1. A la derecha se muestra el giro dentado de un animal que fue expuesto a un ambiente novedoso y que fue sacrificado una hora después de manifestar la conducta exploratoria.

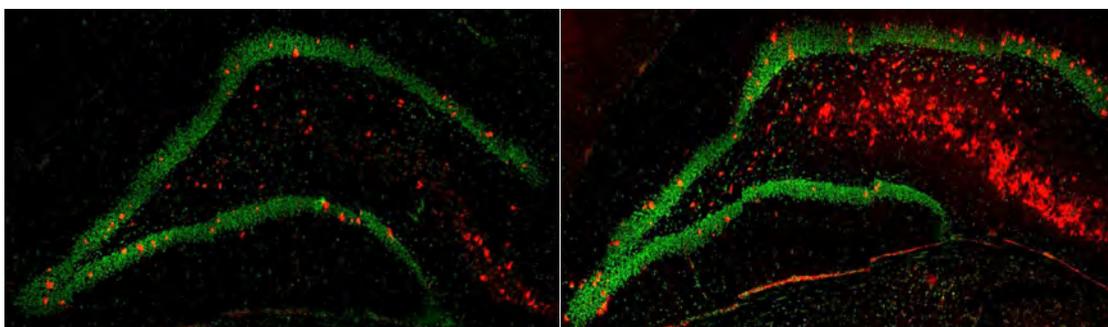


Fig. 11.- Expresión de la proteína Arc en el giro dentado. Imagen reconstruida en mosaico a partir de fotografías individuales que fueron capturadas con un objetivo de 25X. En la imagen se puede apreciar en color rojo a las células que expresan Arc/Arg 3.1 y en verde se observa la contratinción realizada con sitox green que muestra a los núcleos celulares. La figura de la izquierda corresponde a un animal control intacto, mientras que la imagen de la derecha pertenece a un animal sacrificado una hora después de la exploración de un ambiente novedoso.

Después de la exploración de un ambiente novedoso, en el giro dentado se genera de manera continua por un período de ocho horas la expresión de la proteína Arc/Arg 3.1. Con el objetivo de saber si esta cinética temporal se mantiene o se pierde después de la exploración de un ambiente familiar, se

analizó el porcentaje de las neuronas que se activan en los tres puntos temporales (1, 8 y 24 horas después de la prueba conductual) asociados a la exposición a un ambiente novedoso o a un ambiente familiar (Fig.12).

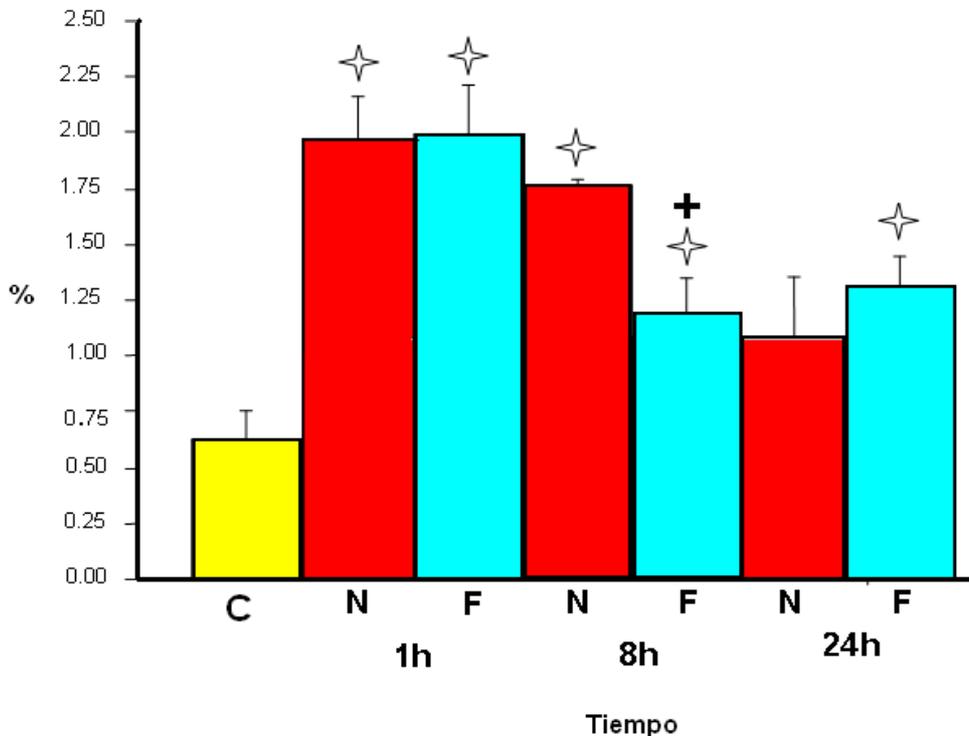


Figura 12.-Dinámica temporal de Arc.. Porcentaje de neuronas que expresan Arc asociadas a la exposición a un ambiente novedoso o a un ambiente familiar. En el eje de las ordenadas se representa el porcentaje de neuronas que expresan Arc, y en el eje de las abscisas se muestran los grupos experimentales. C, Control; N, Novedad; F, Familiaridad. Media± error estándar. *, Control Vs. Novedad y Familiaridad; +, Novedad Vs. Familiar, $p < 0.05$.

Los resultados obtenidos del análisis de la cinética temporal de la expresión de Arc/Arg 3.1 en ambos grupos (Novedad y familiaridad), mostraron que el porcentaje de las neuronas que expresa Arc/Arg 3.1 se eleva significativamente con respecto al grupo control a partir de la primera hora posterior a la exposición a un ambiente novedoso ($p = 0.001$) o a un ambiente familiar ($p = 0.001$).

Además, tanto el grupo de animales que fue expuesto a un ambiente novedoso ($p = 0.00040$), como el grupo que fue sometido a la exposición de un ambiente familiar ($p = 0.040$), presentaron un alto porcentaje de neuronas que expresan Arc/Arg 3.1 con respecto al grupo de animales control intacto a las 8 horas

después de la experiencia conductual. Es decir, tanto la experiencia novedosa, como la familiar generan un incremento en la expresión de Arc/Arg 3.1 con respecto al grupo control a las ocho horas después del evento conductual. Lo que indica que la expresión sostenida se observa en las dos condiciones.

Sin embargo, la comparación entre los dos grupos de animales sacrificados a las ocho horas después de la experiencia conductual (novedad o familiaridad), reflejó una diferencia en el porcentaje de neuronas que expresan Arc/Arg 3.1. Ya que el grupo de los sujetos que fueron expuestos a un ambiente novedoso presentaron un mayor porcentaje de neuronas inmunoreactivas para Arc/Arg 3.1, con respecto al grupo de los sujetos que fueron expuestos a un ambiente familiar ($p = 0.0369$) (Fig. 12). Lo cual demuestra que el grupo expuesto a un ambiente familiar mantuvo un porcentaje de neuronas activas (expresando Arc/Arg 3.1) por encima de las que se presentan de forma regular en el grupo control intacto, pero por debajo de las que presentaron en el grupo que exploró el ambiente novedoso. Estos resultados nos sugieren que la experiencia familiar es capaz de generar la expresión sostenida de Arc/Arg 3.1 solo en una sub-población de las neuronas del ensamble originalmente activado por la experiencia. En la figura 13 se muestran las fotografías del giro dentado de los animales que fueron sacrificados a las 8 horas después de la exploración de un ambiente novedoso y después de la exposición a un ambiente familiar.

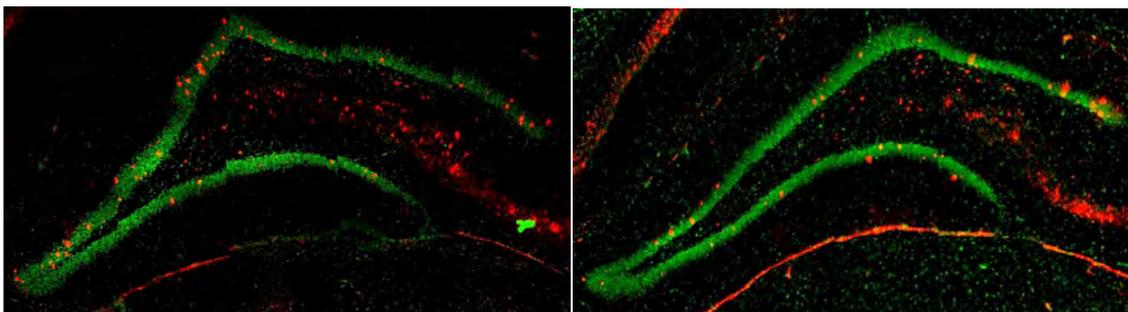


Figura 13.- Expresión de Arc/Arg 3.1 a las 8 horas después de la exploración. La fotografía de la izquierda corresponde al giro dentado de un animal que exploró un ambiente novedoso, mientras que la figura derecha corresponde a un animal que exploró un ambiente familiar. Células que expresan la proteína Arc/Arg 3.1 se muestran en color rojo, y en verde se observa la contratinción realizada con sitox green que muestra a los núcleos celulares.. Mosaico fue construido a partir de la toma de las fotografías individuales obtenidas con objetivo de 25X.

Con respecto a los grupos de los animales sacrificados a las 24 horas, los resultados mostraron que la expresión de Arc/Arg 3.1 después de la exposición a un ambiente novedoso no fue significativamente diferente a la del grupo control intacto ($p = 0.089$).

Lo que indica que la experiencia conductual novedosa no mantiene activo el ensamble hasta este periodo de tiempo, sin embargo, el grupo expuesto a un ambiente familiar presentó un porcentaje de neuronas activas mayor que el del grupo control intacto ($p = 0.015$). Lo anterior indica que el grupo que fue expuesto al ambiente familiar mantuvo activa una sub-población de las neuronas del ensamble original hasta por un periodo de 24 horas posterior al evento conductual familiar.

Interesantemente, la proporción de las neuronas activas en el ambiente familiar fue similar en los grupo sacrificados a las ocho y 24 horas (1.2 y 1.3 % respectivamente) después de la experiencia conductual. Esto sugiere que aunque en la condición familiar existe una disminución en el porcentaje de las neuronas que expresan Arc/Arg 3.1 de forma sostenida, esta se mantiene hasta por lo menos 24 horas después del evento. Es decir, existe una reducción en el tamaño de ensamble que expresa Arc de forma sostenida en el ambiente familiar.

7.2.- Actividad de campo local

La actividad de campo local registrada en el GD y CA3 fue clasificada en tres bandas: Theta (4-11 Hz), Beta (11-20 Hz), y Gama (20-50) Hz. Dentro de la banda theta se realizó un sub-división adicional de tal forma que se clasifico en tres sub-bandas, de baja (4-6 Hz), Alta (6-8 Hz), y de máxima (8-11 Hz) frecuencia. Para realizar la comparación del espectro de la potencia dentro y entre las bandas analizadas se obtuvieron los valores de la potencia relativa de cada banda y sub-bandas.

Debido a que cada estado conductual (Atento-quieto, conductas motoras, sueño MOR, sueño de ondas lentas) generó un patrón de actividad oscilatoria característico, se analizó de forma independiente la actividad oscilatoria

pertenciente a cada estado conductual. En la figura 14, se aprecia el patrón de la actividad oscilatoria registrado en cada estado conductual, el cual cambia a la par con la conducta.

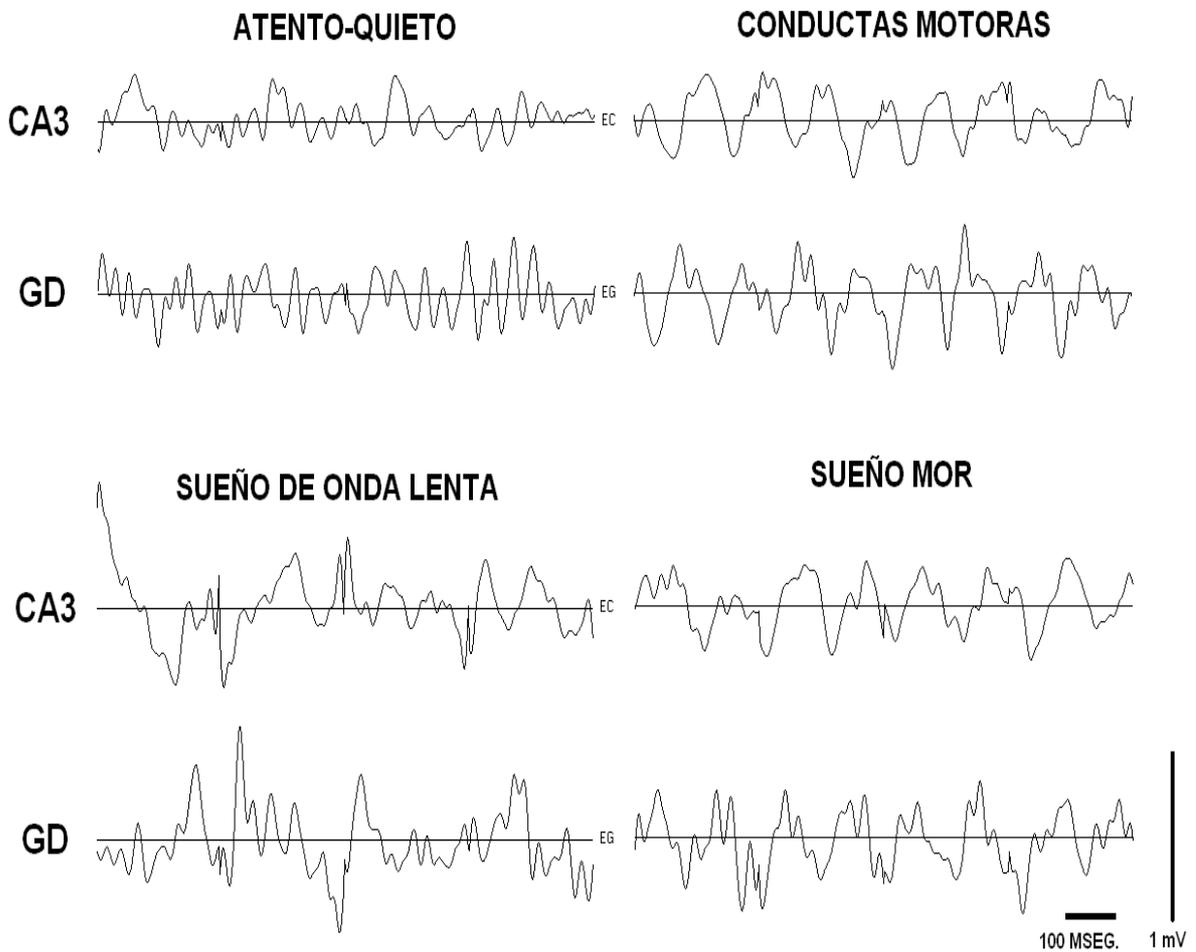


Figura 14.- Actividad de campo local. Registros realizados en el Giro dentado y en el área de CA3. Trazos de un segundo correspondientes a estados conductuales diferentes.

Al analizar la distribución del espectro de la potencia de cada banda, se aprecia claramente que la potencia cambia en relación al estado conductual (Fig. 15). Esto demuestra que el patrón de la actividad oscilatoria de la red cambia en relación a la conducta.

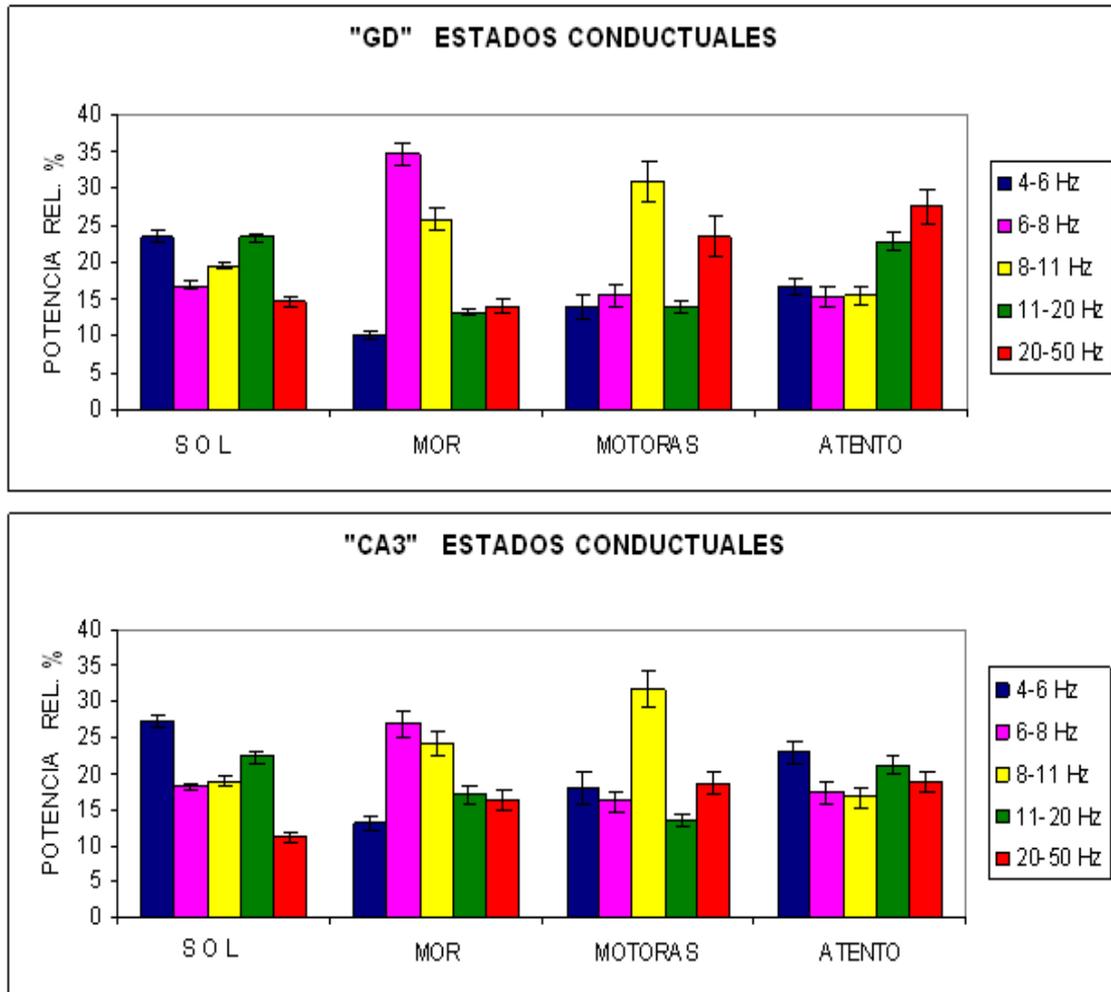


Fig. 15.- Actividad de campo local registrada en el Giro Dentado Y en el área de CA3. El Cambio en el espectro de potencia de cada banda de la actividad oscilatoria dependió del estado conductual. S O L (Sueño de ondas lentas), MOR (Sueño de movimientos oculares rápidos), MOTORAS (desplazamiento y erguidas), ATENTO (atento quieto). Media \pm EE

7.3.- Cinética temporal de la actividad oscilatoria asociada a la exposición de un ambiente novedoso y de un ambiente familiar

Con el objetivo de determinar si la exposición a un ambiente novedoso y a un ambiente familiar generó cambios en la estructura de la actividad oscilatoria de las áreas hipocampales del giro dentado y CA3, se tomaron muestras del EEG en cuatro ventanas temporales (1 hora antes, y 1, 8 y 24 horas después de la exposición a un ambiente novedoso y a un ambiente familiar). Se analizó de forma independiente cada estado conductual.

7.3.1- Actividad oscilatoria del giro dentado

7.3.1.1.- Sueño MOR.- Para el análisis del EEG del área del giro dentado durante el sueño MOR, se registró la señal eléctrica antes y después de la experiencia conductual. Se realizó un ANOVA para cada condición conductual (novedad y familiaridad) en el cual se evaluó la potencia relativa de cada banda a través del tiempo. Así como el cambio en la relación de las potencias entre las bandas del EEG (4-6, 6-8, 8-11, 11-20, 20-50 Hz) a través de los cuatro periodos de registro (1 hora antes de la exploración, y 1, 8 y 24 horas después de la exploración). En las condiciones de novedad y familiaridad, el ANOVA no mostró significancia para ninguno de los factores mencionados en la condición de novedad [$F(12,71) = 0.482, p = 0.919$] y en la condición de familiaridad [$F(12,76) = 1.389, p = 0.170$] (Fig. 16). Esto sugiere que no existen cambios en la potencia dentro de cada banda a través el tiempo, ni en la relación de las potencias entre las bandas a través del tiempo. Sin embargo, debido a que en los análisis se incluyeron las cinco bandas del EEG, y tres de ellas (4-6, 11-20 y 20-30 Hz) no mostraron variación a través de los cuatro periodos de registro, los cambios que ocurrieron en la potencia de las dos bandas restantes (estos fueron evidentes en la estadística descriptiva (6-8, 8-11)) probablemente fueron enmascarados en el análisis estadístico (Fig. 16). Por lo anterior se realizó un ANOVA en el que solo se incluyeron a las bandas del EEG que mostraron cambios a través del tiempo (Fig. 17).

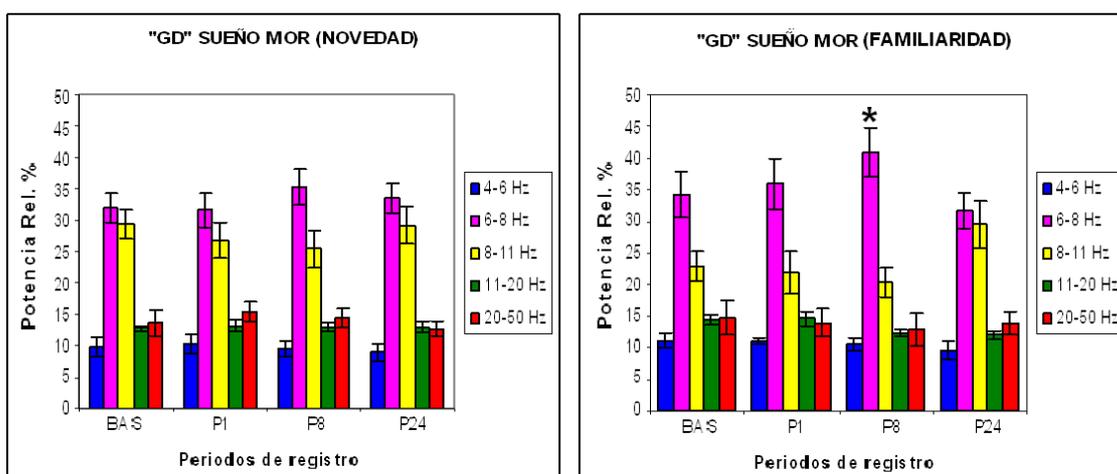


Figura 16.- Sueño MOR (GD). Actividad de campo registrada en el giro dentado en las condiciones conductuales de novedad y de familiaridad. Valores de la potencia relativa de las cinco bandas de la actividad oscilatoria a través de los cuatro periodos de registro: Basal = una hora antes de la exploración, P1-P8-P24= 1,8, 24 Horas después de la exploración. Media \pm EE.

El ANOVA realizado para analizar la relación de las potencias entre las dos bandas a través del tiempo no mostró efecto en la condición de novedad [$F(3,26) = 0.659, p = 0.585$], mientras que para la condición de familiaridad presentó una tendencia [$F(3,28) = 2.866, p = 0.054$] (Fig. 17). La prueba post hoc de Tukey mostró que en la condición de familiaridad existió una diferencia entre las potencias de las dos bandas theta (6-8, 8-11 Hz) exclusivamente a las ocho horas ($p = 0.003$). Lo anterior fue producto de un aumento en la potencia de la banda theta de alta frecuencia (6-8 Hz) y una disminución en la banda theta de máxima frecuencia (8-11 Hz). Estos resultados mostraron que la exposición a un ambiente familiar produce cambios en la potencia de las bandas de actividad theta durante el sueño MOR a las ocho horas después de la experiencia conductual.

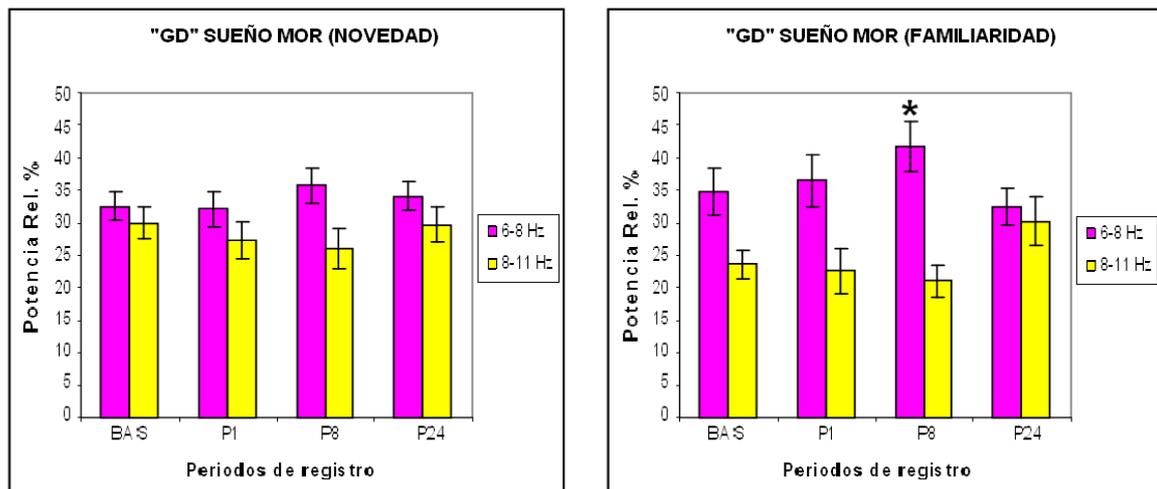


Figura 17.- Sueño MOR sub-bandas theta (GD). Actividad theta registrada en el giro dentado en las condiciones conductuales de novedad y familiaridad. Valores de la potencia relativa de dos bandas de la actividad theta (6-8, 8-11 Hz) a través de los cuatro periodos de registro: Basal = una hora antes de la exploración, P1-P8-P24= 1,8, 24 Horas después de la exploración. Media \pm EE.

7.3.1.2.- Sueño de ondas lentas.- La actividad de campo registrada en el giro dentado durante el sueño de ondas lentas en las mismas ventanas temporales no mostró cambios en la potencia relativa en ninguna de las cinco bandas en las condiciones de novedad [$F(12,76) = 0.264, p = 0.993$] y de familiaridad [$F(12,71) = 0.684, p = 0.761$]. De manera que la experiencia exploratoria no generó cambios en los patrones de la actividad oscilatoria en el giro dentado en la fase de sueño de ondas lentas (Fig. 18).

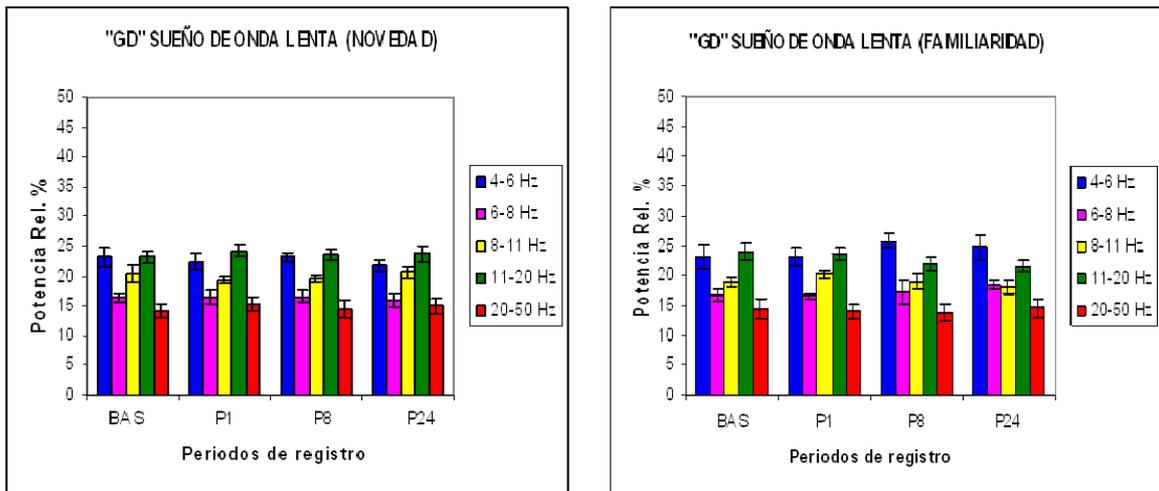


Figura 18.- Sueño de ondas lentas (GD). Actividad oscilatoria registrada en el giro dentado en las condiciones conductuales de novedad y de familiaridad. Valores de la potencia relativa de las cinco bandas de la actividad oscilatoria a través de los cuatro periodos de registro: Basal = una hora antes de la exploración, P1-P8-P24= 1,8, 24 horas después de la exploración. No se aprecian cambios en la potencia relativa de cada banda inducidos por la exploración en ninguno de los cuatro puntos temporales analizados. Media \pm EE.

7.3.1.3.- Conductas motoras (desplazamiento y erguidas).- En la condición de novedad la actividad de campo registrada no mostró cambios significativos según el ANOVA realizado para la interacción entre la potencia relativa de las cinco bandas de la actividad oscilatoria y los cuatro periodos de registro [$F(12,66) = 0.570, p = 0.859$]. Sin embargo, el ANOVA realizado para la condición de familiaridad sí mostró efecto del tiempo sobre la relación de las potencias entre bandas de la actividad oscilatoria [$F(12,66) = 2.329, p = 0.015$] (Fig. 21).

En esta condición se apreció una clara interacción a través del tiempo entre la potencia de la banda theta de máxima frecuencia (8-11 Hz) con la banda gama (20-50 Hz). En el periodo basal se observó que la banda theta de máxima frecuencia es significativamente mayor en potencia sobre el resto de las bandas; theta de baja frecuencia ($p = 0.001$), theta de alta frecuencia ($p = 0.03$), beta ($p = 0.007$), y gama ($p = 0.046$).

Mientras que a las ocho horas se apreció un aumento en la potencia de la banda gama, lo que la llevó a convertirse en la banda que presenta la mayor potencia con respecto a las bandas; theta de baja frecuencia ($p < 0.001$), theta de alta frecuencia ($p = 0.005$), y a la banda beta ($p = 0.002$).

A las 24 horas ninguna de las bandas es significativamente diferente del resto, sin embargo la distribución de las potencias entre las bandas tiende a asemejar a la distribución de bandas generada en la condición basal. Estos resultados nos muestran que la exposición a un ambiente familiar es capaz de producir cambios en la actividad oscilatoria generada posteriormente, la cual se presentó durante la expresión de las conductas voluntarias (erguidas y desplazamiento).

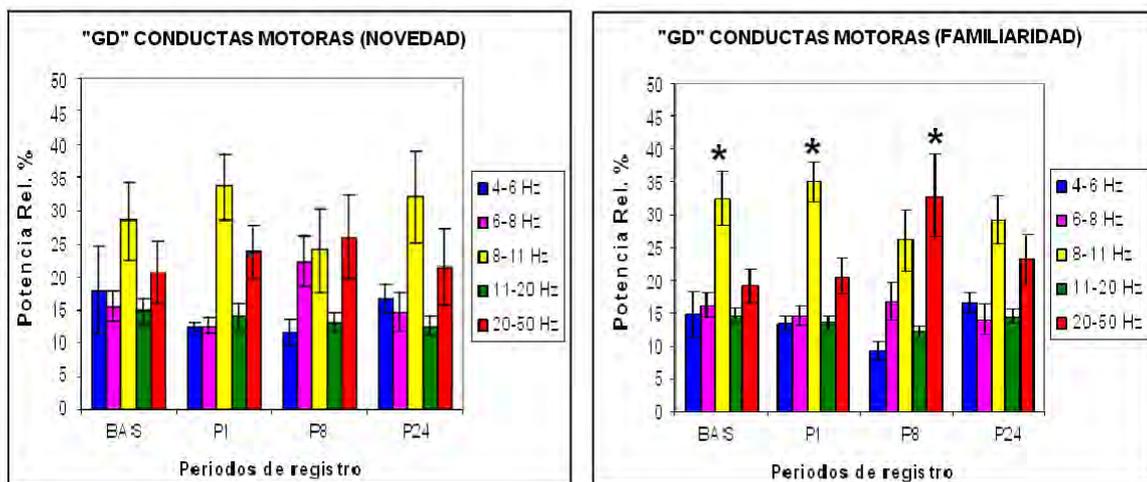


Figura 19.- Conductas motoras (GD). Actividad oscilatoria registrada en el giro dentado en las condiciones conductuales de novedad y de familiaridad. Valores de la potencia relativa de las cinco bandas de la actividad oscilatoria a través de los cuatro periodos de registro: Basal = una hora antes de la exploración, P1-P8-P24= 1,8, 24 Horas después de la exploración. Media \pm EE.

7.3.1.4.- Atento-quieto.- Para el análisis del EEG del área del giro dentado obtenido durante el estado de atento-quieto, se realizó un ANOVA para cada condición conductual (novedad y familiaridad) para evaluar si existe una interacción entre la potencia relativa de cada banda del EEG con respecto a los cuatro periodos de registro.

En ambas condiciones conductuales el ANOVA no mostró efectos significativos [F (12,71) = 0.482, p = 0.919] y [F (12,76) = 1.389, p = 0.170] la novedad y la familiaridad respectivamente (Fig. 20). Lo cual indica que no existieron cambios en la potencia dentro de cada banda, ni en la relación de las potencias entre las bandas a través el tiempo.

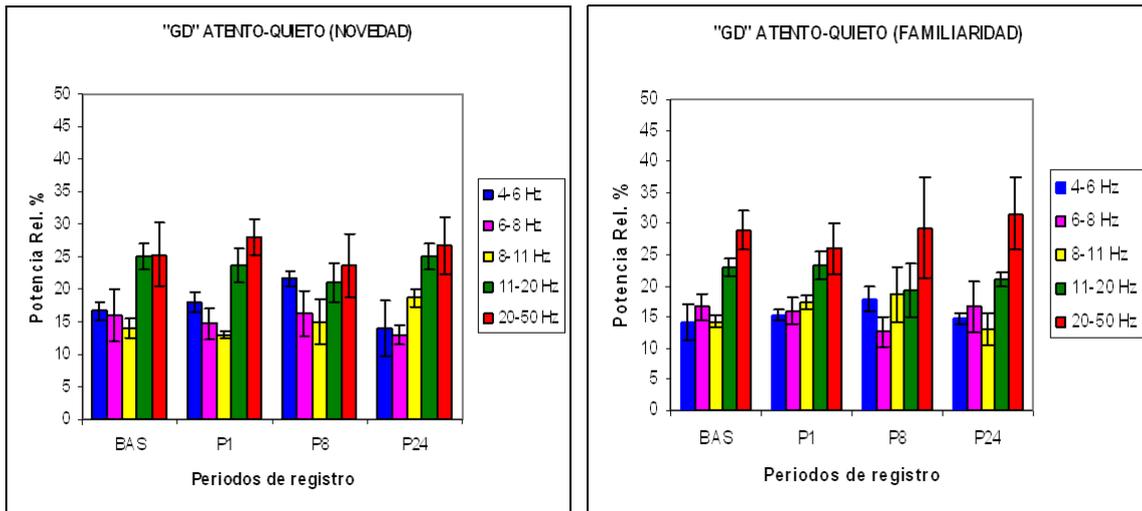


Figura 20.- Atento-quieto (GD). Actividad de oscilatoria registrada en el área hipocampal del giro dentado en la condición de novedad y la condición de familiaridad. Valores de la potencia relativa de las cinco bandas de la actividad oscilatoria a través de los cuatro periodos de registro: Basal = una hora antes de la exploración, P1-P8-P24= 1,8, 24 Horas después de la exploración. El análisis ANOVA no mostró efecto significativo para la interacción entre las bandas de la actividad oscilatoria y periodos de registro en giro dentado. Media \pm EE.

7.3.2.- Actividad oscilatoria del área de CA3

Para determinar si los cambios observados en el área del giro dentado se presentan de manera global en todo el hipocampo o si estos están localmente restringidos al giro dentado, se analizó la actividad oscilatoria del área hipocampal de CA3. Para lo cual se realizó un análisis de forma independiente en cada estado conductual.

7.3.2.1.- Sueño MOR.- En este estado conductual se evaluó el efecto del tiempo sobre la potencia de las bandas de la actividad oscilatoria en la condición de novedad y en la condición de familiaridad. El ANOVA para la interacción entre los periodos de registro y la potencia de las bandas del EEG no mostró significancia en la condición de novedad [$F(12,71) = 1.114$, $p = 0.363$], y de familiaridad [$F(12,76) = 0.613$, $p = 0.825$] (Fig. 21). Sin embargo, al igual que la actividad oscilatoria del área de giro dentado, en este estado conductual se aprecia la existencia de un cambio en la potencia de las bandas de la actividad theta (6-8, 8-11 Hz) a través del tiempo, por lo cual se realizó un análisis estadístico independiente para estas dos bandas.

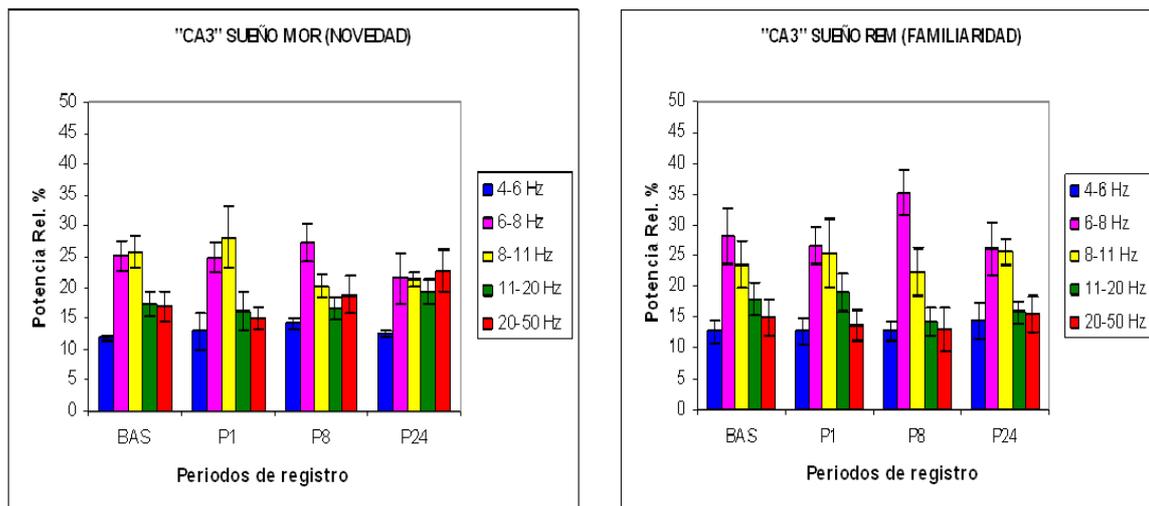


Figura 21.- Actividad oscilatoria registrada en el área de CA3 durante el sueño MOR en las condiciones conductuales de novedad y de familiaridad. Valores de la potencia relativa de las cinco bandas de la actividad oscilatoria a través de los cuatro periodos de registro: Basal = una hora antes de la exploración, P1-P8-P24= 1,8, 24 Horas después de la exploración. Media \pm EE.

La comparación de la potencia entre las dos bandas de actividad theta en las condiciones de novedad y de familiaridad no mostró efecto del tiempo en ninguna de las condiciones [$F(3,26) = 2.074, P = 0.128$] y [$F(3,28) = 2.129, P = 0.119$] respectivamente (Fig. 22). Estos datos demuestran que en área de CA3 no se generaron cambios en la actividad oscilatoria durante la etapa de sueño MOR en relación a una experiencia conductual previa.

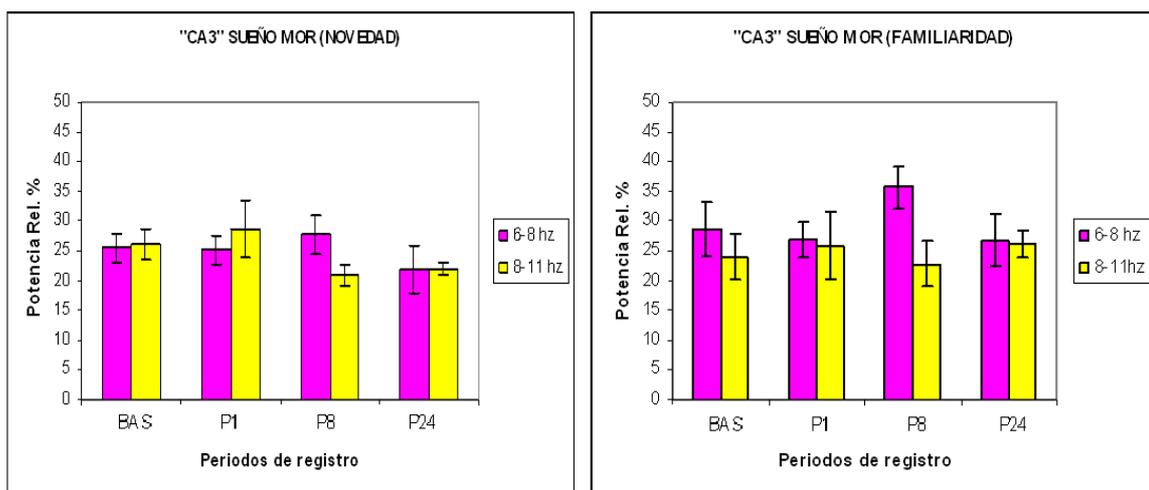


Figura 22.- Sueño MOR, sub-bandas (CA3). Actividad theta registrada en el área de CA3 durante el sueño MOR en las condiciones conductuales de la novedad y la familiaridad. Valores de la potencia relativa de las dos bandas theta (6-8, 8-11 Hz) a través de los cuatro periodos de registro: Basal = una hora antes de la exploración, P1-P8-P24= 1,8, 24 Horas después de la exploración. Media \pm EE.

7.3.2.2.- Sueño de ondas lentas.- En el área de CA3 la actividad oscilatoria registrada durante el sueño de ondas lentas dentro de las cuatro ventanas temporales no mostró cambios en la potencia relativa de las cinco bandas en las condiciones de novedad [$F(12,76) = 0.684, p = 0.761$] y de familiaridad [$F(12,76) = 1.761, p = 0.07$]. Sin embargo, en la figura 23 se puede observar que la banda theta de baja frecuencia (4-6 Hz) y la banda beta (11-20 Hz) presentan cambios a través del tiempo en ambas condiciones conductuales.

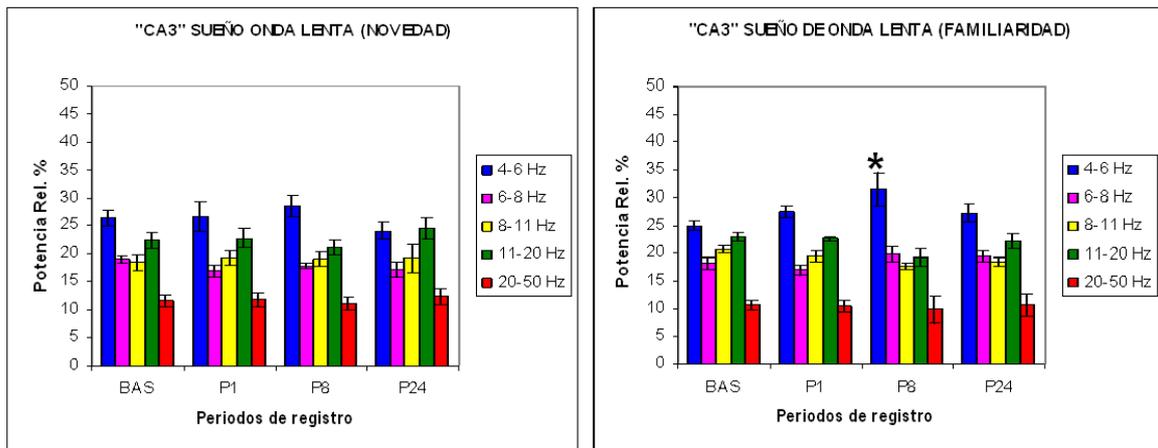


Figura 23.- Sueño de onda lenta (CA3). Actividad oscilatoria registrada en el área de CA3 durante la fase de sueño de ondas lentas en las condiciones conductuales de novedad y de familiaridad. Valores de la potencia relativa de las cinco bandas de la actividad oscilatoria a través de los cuatro periodos de registro. Media \pm EE.

Para determinar si existe efecto del tiempo para cada condición conductual, se realizó un ANOVA en el que se comparó la relación de potencia entre las dos bandas a través del tiempo en la condición de novedad y en la condición de familiaridad (Fig. 24). Para la condición de novedad el análisis de la varianza no mostró significancia [$F(3,28) = 1.475, p = 0.243$], sin embargo para la condición de familiaridad se observó un efecto de la interacción entre periodos de registro y potencia de las bandas [$F(3,28) = 4.350, p = 0.012$]. De manera que la relación de la potencia entre las dos bandas cambió con respecto al tiempo de registro. El análisis post hoc de Tukey mostró que en la condición familiar la potencia de la banda theta de baja frecuencia (4-6 Hz) fue significativamente mas alta que la potencia de la actividad beta ($p < 0.001$) a las ocho horas posteriores a la exploración). Mientras que en los periodos de registro restantes no existió diferencia en la potencia de las dos bandas. Estos resultados muestran que en el área de CA3 la experiencia familiar induce cambios en el

patrón de la actividad oscilatoria a las ocho horas después de la experiencia familiar.

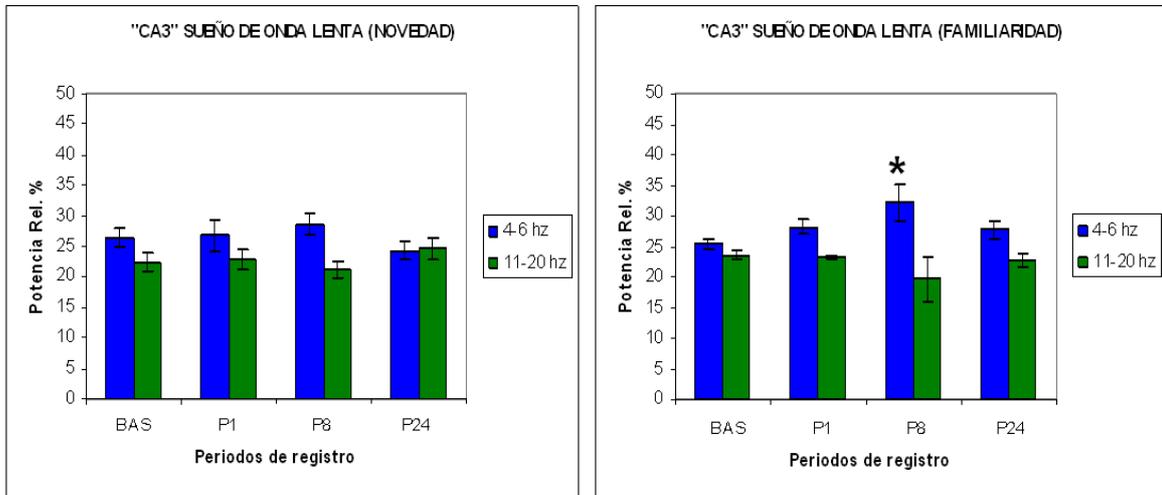


Figura 24.- Sueño de onda lenta, sub-bandas (CA3). Actividad oscilatoria registrada en el área de CA3 durante la fase de sueño de ondas lentas en las condiciones conductuales de novedad y de familiaridad. Valores de la potencia relativa de la banda theta (4-6 Hz) y beta (11-20 Hz) a través de los cuatro periodos de registro. Media \pm EE.

7.3.2.3.- Conductas motoras.

En el área de CA3 no se apreciaron cambios a través del tiempo en la actividad oscilatoria generada durante la expresión de las conductas motoras, ya que el ANOVA no mostró efectos significativos para tal interacción en la condición de novedad [$F(12,70) = 1.316, p = 0.229$] y en la condición de familiaridad [$F(12,66) = 1.200, p = 0.302$] (Fig. 25).

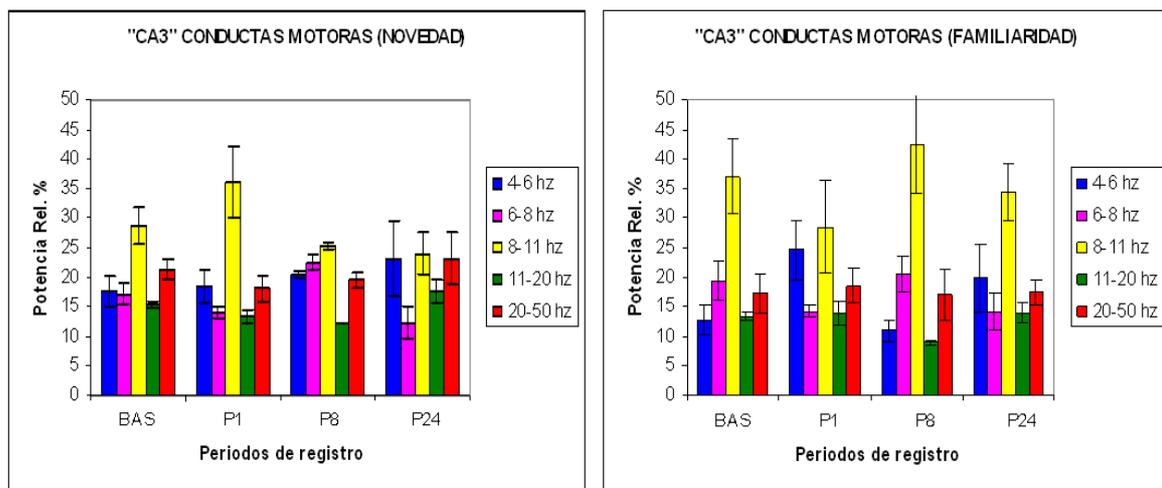
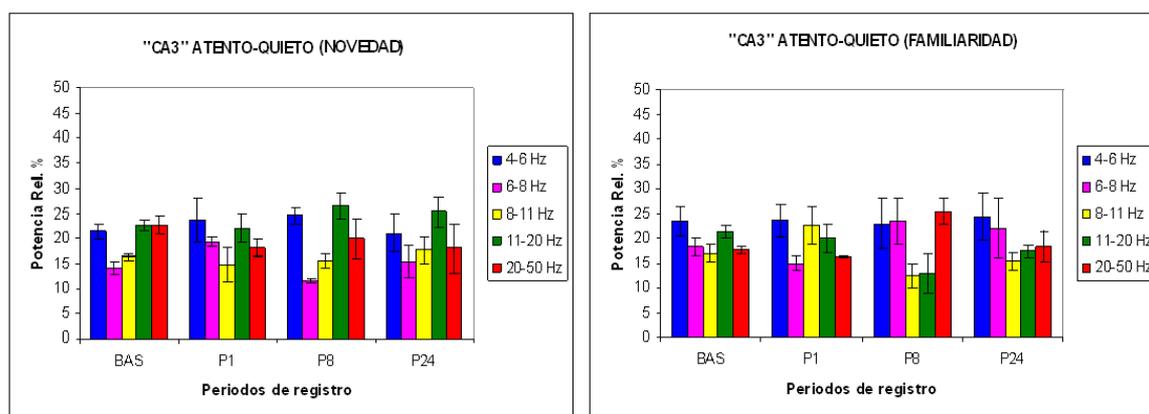


Figura 25.- Conductas Motoras (CA3). Actividad oscilatoria registrada en el área de CA3 durante la expresión de las conductas motoras en las condiciones conductuales de novedad y de familiaridad. Valores de la potencia relativa de las cinco bandas de la actividad oscilatoria a través de los cuatro periodos de registro. Media \pm EE.

Estos resultados mostraron que en el área de CA3 no se generan cambios asociados a una experiencia previa en la estructura de la actividad oscilatoria registrada durante la expresión de las conductas motoras.

7.3.2.4.- Atento-Quieto.- Durante el estado conductual atento-quieto, el ANOVA mostró que la potencia relativa no sufrió cambios a través del tiempo asociados a la exposición a un ambiente novedoso [$F(12,33) = 0.722, p = 0.720$] o a un ambiente familiar [$F(12,38) = 1.441, p = 0.197$] en el área de CA3 (Fig. 26).



26.- Atento-Quieto (CA3).- Actividad de oscilatoria registrada en el área de CA3 en el estado de atento-quieto asociada a la exposición de un ambiente novedoso y un ambiente familiar. Valores de la potencia relativa de las cinco bandas de la actividad oscilatoria a través de los cuatro periodos de registro. Media \pm EE.

En resumen los resultados mostraron que el fenómeno de la expresión sostenida de Arc/Arg 3.1 se acopló con la actividad oscilatoria del giro dentado solo en condiciones específicas, cómo por ejemplo durante el manejo de la información familiar, y no durante el manejo de la información novedosa. Ya que solo en la condición de familiaridad se observó una la disminución en el tamaño de la población que expresa Arc/Arg 3.1 de forma sostenida, la cual coincidió temporalmente con los cambios en el patrón de actividad theta del giro dentado

Las principales aportaciones de este trabajo son las siguientes:

- a) Durante la exposición a un ambiente familiar ocurre la expresión sostenida de ArcArg 3.1 en el giro dentado, pero solo en un sub-grupo de las neuronas pertenecientes al ensamble activado por la experiencia.
- b) Este subgrupo de neuronas permanece activo (expresando Arc/Arg 3.1) hasta por un periodo de 24 horas posterior a la experiencia familiar.
- c) La actividad oscilatoria en el giro dentado fue afectada por la exposición a un ambiente familiar, pero no por la exposición a un ambiente novedoso.
- d) Los cambios en la estructura de la actividad oscilatoria ocurrieron principalmente a las ocho horas (ventana temporal en la que se disminuye el porcentaje de las células que expresan Arc/Arg 3.1) después de la exposición a un ambiente familiar.

8.- DISCUSIÓN

8.1.- Papel de la expresión sostenida de Arc/Arg 3.1 en el giro dentado

En este trabajo se demostró que la exposición a un ambiente familiar es capaz de inducir la expresión de Arc/Arg 3.1 en valores similares a los obtenidos en los sujetos que fueron sometidos a la exposición de un ambiente novedoso. Sin embargo, la condición familiar no fue capaz de mantener de forma sostenida la expresión de Arc/Arg 3.1 en todo el ensamble reclutado por la experiencia. Ya que se encontró que el porcentaje de las células que expresaron la proteína Arc/Arg 3.1 de forma sostenida se redujo de manera significativa en los sujetos que fueron expuestos a un ambiente familiar en comparación con los sujetos que exploraron un ambiente novedoso.

Una observación interesante fue que en la condición de familiaridad la subpoblación que expresó Arc/Arg 3.1 de forma sostenida permaneció activa hasta por un periodo de 24 horas posterior al evento. Esto fue determinado cuando se encontró que en los animales expuestos al ambiente familiar el porcentaje de las neuronas que expresaron Arc/Arg 3.1 se mantuvo en valores altos con respecto a los sujetos control (animales que no fueron manipulados conductualmente), aun a las 24 horas después del evento conductual.

Estudios previos demostraron que la exposición a un ambiente familiar es capaz de inducir la transcripción del ARN nuclear de Arc/Arg 3.1 en las áreas de CA3 y CA1 (Guzowski et al., 2006). Sin embargo, en dicho estudio no se investigó si éste transcrito reciente puede viajar a las dendritas y traducirse a proteína para establecer su función. Por lo anterior, en el presente trabajo se demostró que una experiencia familiar si es capaz de inducir la expresión de la proteína Arc/Arg 3.1 en el giro dentado. Ya que después de una experiencia novedosa o después de una experiencia familiar, en el giro dentado se activó el 2% de sus neuronas a través de la expresión de Arc/Arg 3.1. Lo cual sugiere que la expresión de proteínas asociadas a la plasticidad no es exclusiva del manejo de la información novedosa, si no que el manejo de información previamente almacenada también induce la expresión de proteínas relacionadas a la plasticidad sináptica.

Uno de los intereses de este trabajo fue el de tratar de asociar un papel funcional a la expresión sostenida de Arc/Arg 3.1. En relación a tal punto, en el presente estudio se encontró que el fenómeno de la expresión sostenida de Arc/Arg 3.1 presentó cambios cuantitativos asociados a las características de la información procesada. Ya que después de una experiencia novedosa todo el ensamble se mantiene activo expresando la proteína Arc/Arg 3.1 hasta las ocho horas, mientras que después de una experiencia familiar solo una subpoblación del ensamble se mantuvo activa, pero perduro hasta las 24 horas.

Entre los factores que pudieron influir en los mecanismos moleculares que determinaron que en la condición de la novedad se mantuviera el fenómeno de la expresión sostenida en todo el ensamble, puede encontrarse la actividad de los sistemas neuromoduladores. En trabajos anteriores se ha demostrado que en el giro dentado las experiencias novedosas, pero no las experiencias familiares, son capaces de generar un reforzamiento en la PLP, el cual fue expresado cómo la transformación de la PLP temprana a una PLP tardía (Straube et al 2003). Este reforzamiento fue bloqueado por la aplicación de antagonistas β -adrenérgicos, por lo que se sugirió que el reforzamiento de la PLP inducido por una experiencia novedosa requiere de la activación de los receptores β -adrenérgicos (Straube et al., 2003).

Adicionalmente se ha reportado que la noradrenalina (NA) y la acetilcolina (Ach) incrementan su liberación durante una experiencia novedosa con respecto a una experiencia familiar (Vankov et al., 1995; Giovannini et al., 2001). Es probable que durante la exploración de un ambiente novedoso, la alta tasa de actividad de los sistemas neuromoduladores participe en la expresión sostenida de Arc/Arg 3.1, así como el reforzamiento de la PLP. Evidencia a favor de esta hipótesis proviene de un estudio en el que se encontró que la actividad de los receptores colinérgicos muscarínicos (mAChR) de tipo M1 y M3, produce un incremento en los niveles del ARNm *Arc/Arg 3.1*, y que este efecto es mediado a través de la tirosina cinasa citoplasmática (Src) y la proteína cinasa C (PKC (Teber et al., 2004). Por otra parte se ha demostrado que la eliminación de los sistemas neuromoduladores del hipocampo inhibe la expresión del ARNm *Arc/Arg 3.1* que se induce conductualmente (Fletcher et al., 2006; Fletcher 2007).

Por lo tanto, un mecanismo posible para la regulación de la expresión sostenida de Arc/Arg 3.1 es que las altas concentraciones de los neuromoduladores como Ach y NA puedan desencadenar la expresión sostenida de Arc/Arg 3.1 y probablemente la de otras proteínas asociadas a la plasticidad para reforzar las conexiones sinápticas. En este estudio se propuso que la experiencia novedosa desencadena la expresión sostenida de Arc/Arg 3.1 en todo el ensamble (a través del incremento en la concentración de la NA y la Ach) como un mecanismo necesario para la formación de nuevas memorias. En tanto que en la experiencia familiar no se generó la expresión sostenida en todo el ensamble probablemente debido a la baja concentración de Ach y NA con respecto a la condición de novedad. Por lo cual, se propone que el manejo de información previamente almacenada no requiere de los cambios plásticos asociados a la expresión de Arc/Arg 3.1 dentro de todo el ensamble, pero si dentro de una sub-población del ensamble, la cual perduro activa hasta las 24 horas posteriores a la experiencia familiar.

En resumen los resultados demostraron que las características de la información procesada por el giro dentado determinan la dinámica de la expresión sostenida de Arc/Arg 3.1.

8.2.- Efecto de la experiencia conductual sobre los patrones de la actividad oscilatoria de las redes hipocampales

El segundo punto al cual se centro este trabajo, fue el determinar un posible origen de la expresión sostenida de Arc/Arg 3.1. Para lo cual se analizó si el patrón de la actividad oscilatoria de las redes del giro dentado y del área de CA3 se correlaciona con la expresión de Arc/Arg 3.1.

Los resultados del análisis de la actividad oscilatoria mostraron que en la condición novedosa no se generaron cambios en el espectro de la potencia de las bandas del EEG dentro de las ventanas temporales utilizadas para analizar la expresión sostenida de Arc/Arg 3.1. Esto sugiere que durante el manejo de la información novedosa no existió una asociación entre la expresión sostenida con cambios en el patrón de la actividad oscilatoria.

Sin embargo, en la condición familiar se demostró la presencia de cambios en el patrón de la expresión sostenida de Arc/Arg 3.1 asociados con las modificaciones en la actividad oscilatoria del giro dentado. Estas modificaciones ocurrieron en el sueño MOR y durante las conductas motoras, exclusivamente a las ocho horas después de la experiencia conductual. Este hecho atrae la atención, debido a que esta ventana temporal (en la que coinciden los cambios en el patrón de expresión sostenida de Arc/Arg 3.1 con los cambios en la actividad oscilatoria), es crítica para la consolidación de las memorias (Karni y Sagi, 1993; Dudai, 2004). Por lo anterior, es posible que ambos fenómenos sean complementarios y que los cambios en el patrón de la actividad oscilatoria estén participando en la reducción del tamaño del ensamble que expresa Arc/Arg 3.1 de forma sostenida y en el mantenimiento en el largo plazo de hasta por 24 horas de tal expresión.

Los cambios en la actividad theta en la fase del sueño MOR fueron exclusivos del área del giro dentado debido a que no se observaron en el área de CA3, lo cual demuestra la independencia de cada estructura para el procesamiento de la información. En este sentido, la expresión sostenida y los cambios en el patrón de la actividad oscilatoria fueron específicos de la estructura del giro dentado. Por lo cual, estos se pueden asociar al establecimiento de la función de la red del giro dentado. Aunque los patrones de la actividad oscilatoria sean semejantes entre el área del giro dentado y de CA3, existen diferencias que probablemente se originan por la arquitectura y papel funcional de cada circuito. Por ejemplo, en base a trabajos anteriores, se ha demostrado que la actividad gama del giro dentado es de mayor amplitud que la actividad gama de las otras estructuras hipocampales (Motgomery et al, 2008). De acuerdo con esto, en el presente estudio se mostró que la potencia de la actividad gama del giro dentado es aproximadamente 30% mas elevada que la del área de CA3.

En resumen los resultados muestran las características de la información procesada por el giro dentado determina a los patrones de la expresión sostenida, y que los cambios en la expresión sostenida de Arc/Arg 3.1 (reducción en el tamaño del ensamble que expresa Arc/Arg 3.1 de manera sostenida) se asocian con las modificaciones en el patrón de la actividad oscilatoria de la red local del giro dentado.

8.2.1.- Modificaciones en la actividad oscilatoria durante el sueño, y su relación con los cambios en el patrón de la expresión sostenida de Arc/Arg 3.1.

Sueño Mor.- En este trabajo se mostró que en el giro dentado se generaron cambios en la actividad theta durante el sueño MOR asociados a la exposición de un ambiente familiar. En relación con estos datos, un estudio reciente mostró que los animales que aprendían exitosamente una prueba de memoria exhibieron un incremento en la potencia de la actividad theta y beta registrada en el sueño MOR entre las 17 y 20 horas después del primer día de entrenamiento (Fogel et al., 2009). Los autores sugirieron que el incremento en la actividad theta durante una ventana de sueño MOR puede ser importante para la comunicación hipocampo-cortical que subyace a la reactivación de trazos de memoria nuevamente formados. En relación a esta propuesta, en el presente trabajo se observó en el área del giro dentado se generó un incremento en la potencia de la banda theta de alta frecuencia (6-8 Hz) a la par con una disminución en la actividad theta de máxima frecuencia (8-11 Hz) a las ocho horas posteriores a la experiencia conductual familiar. A diferencia de la condición de novedad, donde se mostró que ambas bandas presentaban un espectro de potencia semejante.

En el presente trabajo se demostró que en la condición de familiaridad existió una coincidencia entre el cambio en el patrón de la actividad theta durante la fase de sueño MOR y la reducción en el tamaño del ensamble que expresó Arc/Arg 3.1 de forma sostenida. De acuerdo con la participación del sueño MOR en la regulación de la reactivación de los genes de expresión temprana, se ha demostrado que la expresión del ARNm de *zif-268* inducida por una experiencia conductual o por la estimulación de alta frecuencia, es reactivada durante el sueño MOR posterior al evento de estimulación (Ribeiro et al., 1999; Ribeiro et al., 2002). Adicionalmente se encontró que la inducción de la PLP hipocampal produce olas de expresión del gen *zif-268* en los periodos subsecuentes a la estimulación. Las olas de reactivación de *zif-268* ocurrieron exclusivamente en la fase de sueño MOR (Ribeiro et al., 2002). A nivel celular, se ha observado que la privación de sueño MOR produce deficiencias en la plasticidad sináptica, debido a que afecta el mantenimiento de la PLP

(Davis et al., 2003). Por lo cual, el sueño MOR juega un papel importante en la regulación de la expresión de genes y en el control de los cambios en la plasticidad sináptica.

El papel del sueño MOR en la plasticidad sináptica es consistente con la presencia de actividad oscilatoria theta en el hipocampo durante este estado (Vanderwolf, 1969), la cual también se ha observado que favorece a los procesos de la plasticidad sináptica y que permite el procesamiento de la información durante la ejecución de las pruebas de memoria (Olvera Cortés et al., 2002; Olvera Cortés et al., 2004; Hasselmo, 2005; Winson, 1978). En este sentido la actividad theta (generada durante sueño MOR o durante la vigilia con estados de alerta elevados, como en las conductas exploratorias) puede favorecer la sincronización de los ensambles neuronales, necesaria para la inducción de los cambios plásticos en la transmisión sináptica y así como para desencadenar la activación de cascadas moleculares que involucren la expresión de genes, la síntesis de proteínas, y la consolidación de las memorias (Fletcher et al., 2006; Kubik et al., 2007; Pavlides et al., 1988; Orr, 2001; Tsanov y Manahan-Vaughan, 2009; Buzsáki, 2002; Buzsáki y Draguhn, 2004). En resumen, durante el sueño MOR la actividad theta parece favorecer a la expresión de genes a través de la sincronización de los ensambles neuronales que induce la expresión de los cambios plásticos.

En base a lo anterior es posible sugerir que los cambios en la actividad oscilatoria que ocurren a las ocho horas después de la experiencia familiar faciliten el mantenimiento de hasta las 24 horas de la expresión sostenida de Arc/Arg 3.1 en la sub-población activa. Para probar tal hipótesis es necesario demostrar si existe relación causal entre ambos eventos, es decir si los cambios en el patrón de actividad oscilatoria, podrían propiciar el mantenimiento sostenido de la expresión de Arc hasta por 24 horas en la sub-población activa.

Debido a que la actividad theta de baja frecuencia es favorecida por la actividad colinérgica (Buzsáki, 2002). En este trabajo se encontró que en el sueño MOR la actividad theta de 6-8 Hz aumenta a la par con la disminución de la actividad theta de 8-11 Hz. Por lo cual es probable que estos cambios involucren un

componente colinérgico, ya que el sueño MOR es un estado en el cual se presentan altas concentraciones de Ach. En este sentido, es conocido que la actividad theta favorece a la sincronía de los ensambles y que la actividad colinérgica induce expresión de Arc/Arg 3.1. Por lo que es probable que la disminución en el tamaño del ensamble que expresa Arc/Arg 3.1 de forma sostenida y el aumento en la duración de la expresión de Arc/Arg 3.1 este participando el cambio en el patrón de la actividad theta y los cambios en la actividad colinérgica.

Sueño de ondas lentas.- La actividad oscilatoria obtenida durante el sueño de ondas lentas mostró un aumento en la banda theta de baja frecuencia a la par con una disminución en la banda beta a las ocho horas después de la exposición a un ambiente familiar exclusivamente en el área de CA3. Debido a que se ha demostrado que la fase de sueño de ondas lentas es un estado propicio para el control homeostático de la fuerza sináptica mediante la despotenciación de la eficacia sináptica o el escalamiento sináptico (Vyazovskiy et al., 2008), quizás los cambios en la actividad oscilatoria favorecan a los cambios en la fuerza sináptica asociados a la despotenciación. De acuerdo con esta hipótesis se ha demostrado que la expresión de los genes relacionados a la plasticidad sináptica es alta en los estados de vigilia espontánea, de sueño MOR, o en la privación de sueño, comparado a estados de sueño de ondas lentas (Cerilli y Tononi, 2000; Ribeiro et al., 1999).

En resumen, se observó que la experiencia familiar generó cambios en la actividad oscilatoria a las ocho horas posterior a la experiencia en ambas áreas hipocampales. Sin embargo, el área donde ocurrieron los cambios dependió del estado conductual, ya que durante sueño de ondas lentas los cambios se observaron en el área de CA3, mientras que en el estado de sueño MOR y en las conductas motoras los cambios ocurrieron en el giro dentado. Lo que sugiere que cada área hipocampal juega papeles complementarios en los procesos de la memoria.

8.2.2.- Modificaciones en la actividad oscilatoria dentro de los estados conductuales de vigilia-alerta inducidas por una experiencia previa

Conductas Motoras- Se ha encontrado que los patrones de la actividad oscilatoria de frecuencia theta generados durante las conductas motoras (asociadas con la extracción de la información ambiental como en el desplazamiento y en las erguidas), favorecen al procesamiento de la información proveniente del ambiente exterior (Vinogradova, 1995) y de las experiencias del aprendizaje durante la ejecución de las tareas (Olvera-Cortes et al., 2002; Olvera Cortes et al 2004). Adicionalmente se ha demostrado que estos patrones de actividad permiten la inducción de los cambios plásticos inducidos por el aprendizaje o la estimulación eléctrica (Kwag y Paulsen, 2009; Buzsaki, 2002; Fletcher et al., 2006).

Sin embargo en el actual trabajo, se encontró evidencia de que características específicas de una experiencia conductual previa (experiencia familiar), fueron capaces de producir modificaciones en la actividad oscilatoria registrada durante la expresión de conductas motoras (desplazamiento-erguidas) generadas dentro de una caja hogar. Ya que estas conductas se relacionan con la codificación de la información que se esta recibiendo del exterior, en este estudio se encontró que una experiencia conductual anterior con características específicas puede modificar la estructura oscilatoria durante las conductas motoras y por lo cual es probable que se modifique la forma en que se procesa la información actual. Ya que la actividad theta regula a la actividad de las células de lugar (células que codifican la información espacial de un ambiente explorado), un cambio en la actividad theta puede ejercer un fuerte impacto sobre la codificación de la información espacial llevada a cabo por estas células.

9.- CONCLUSIONES

El fenómeno de la expresión sostenida de Arc/Arg 3.1 el cual se presenta en el 2 % de la población después de la exposición a un ambiente novedoso, solo se presentó en una sub-población del 1.2 % de las células después de la exposición a un ambiente familiar. Esta diferencia en el tamaño del ensamble neuronal activado de forma persistente posiblemente reflejé la diferencia en las características de la información procesada en el giro dentado, es decir entre la novedad y la familiaridad. En este contexto, un dato interesante es que la exposición a un ambiente familiar prolongó la expresión sostenida de Arc/Arg 3.1 hasta las 24 horas después de la experiencia conductual. Esto difiere de hallazgos previos que muestran que la expresión sostenida solo se mantiene por 8 horas. La posible significancia funcional de este evento puede relacionarse con la actualización de la información previamente codificada, debido a que el manejo de información familiar probablemente genere cambios plásticos más localizados (en un sub-grupo de la población celular), pero en una ventana temporal mayor para asegurar la estabilización de las conexiones sinápticas.

Al analizar la actividad de campo local en la red del giro dentado se observó una asociación temporal entre los cambios en la actividad oscilatoria y el patrón temporal de la expresión de Arc/Arg 3.1. Ya que en la condición familiar la disminución en la proporción de neuronas que expresaron Arc/Arg 3.1 de forma sostenida, coincidió temporalmente con los cambios en el patrón de la actividad theta generados durante el sueño MOR. La actividad theta es un estado óptimo para la inducción de los cambios en la plasticidad sináptica y para controlar la expresión de Arc, por lo cual se ha sugerido que los cambios en el patrón de la actividad theta generados en la fase de sueño MOR pueden ser los responsables de la disminución en el tamaño de la población y del mantenimiento en el largo plazo de la expresión de Arc/Arg 3.1. Es probable que los efectos de la actividad theta sobre la expresión de Arc/Arg 3.1 se originen a través de un mecanismo dependiente de la actividad colinérgica, ya que es conocido que esta se eleva en la fase de sueño MOR, modula el patrón de actividad oscilatoria theta e induce la expresión de Arc/Arg 3.1.

10.- REFERENCIAS

1. Abraham WC, Dragunow M y Tate WP. 1991. The role of immediate early genes in the stabilization of long-term potentiation. *Mol. Neurobiol.* 5, 297-314.
2. Barria A, Muller D, Derkach V, Griffith LC y Soderling TR. 1997. Regulatory Phosphorylation of AMPA-Type Glutamate Receptors by CaM-KII During Long-Term Potentiation. *Science.* 276, 2042-2045.
3. Başar E. 2004. *Memory and Brain Dynamics: Oscillations Integrating Attention, Perception, Learning and Remembering.* CRC Pr., New York.
4. Bliss TVP, y Lomo T. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* 232, 331-356.
5. Bland BH y Colom LV. 1993. Extrinsic and intrinsic properties underlying oscillation and synchrony in limbic cortex. *Prog. Neurobiol.* 41, 157-208.
6. Bramham CR. 2008. Local protein synthesis, actin dynamics, and LTP consolidation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 18, 524-531.
7. Buckley MJ, y Gaffan D. 2000. The hippocampus, perirhinal cortex, and memory in the monkey. En: J.J. Bolhuis (Eds), *Brain, Perception, and Memory: Advances in Cognitive Neuroscience.* (pp. 279–298) Oxford University Press, Oxford..
8. Burgess N, Maguire EA y O'Keefe J. 2002. The human hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron.* 35, 625–641.
9. Buzsáki G. 2006. *Rhythms of the brain.* Oxford University Press.
10. Buzsáki G y Draguhn A. 2004. Neuronal Oscillations in Cortical Networks. *Science.* 304, 1926–1929.
11. Buzsáki G, Leung L, y Vanderwolf CH. 1983. Cellular bases of hippocampal EEG in the behaving rat. *Brain Res. Rev.* 139-171.
12. Buzsáki G. 2002. Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron.* 33, 325–340.
13. Chowdhury S, Shepherd JD, Okuno H, Lyford G, Petralia RS, Plath N, Kuhl D, Hugarir RL y Worley PF. 2006. Arc/Arg3.1 interacts with the endocytic machinery to regulate AMPA receptor trafficking. *Neuron.* 52, 445–459.

14. Cirelli C y Tononi G. 2000. Differential expression of plasticity-related genes in waking and sleep and their regulation by the noradrenergic system. *J Neurosci.* 20, 9187-94.
15. Colom LV, Nassif-Caudarella S, Dickson CT, Smythe JW y Bland BH. 1991. *In vivo* intrahippocampal microinfusion of carbachol and bicuculline induces theta-like oscillations in the septally deafferented hippocampus. *Hippocampus.* 1, 381-390.
16. Davis CJ, Harding JW y Wright JW. 2003. REM sleep deprivation-induced deficit in the latency-to-peak induction and maintenance of long-term potentiation within the CA1 region of the hippocampus. *Brain Res.* 973, 293-297.
17. Dudai Y. 2004. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Ann. Rev. Psychol.* 55, 51-86.
18. Fletcher BR, Calhoun ME, Rapp PR y Shapiro ML. 2006. Fornix lesion decouple the induction of hippocampal Arc transcription from Behavior but not plasticity. *J. Neurosci.* 26, 1507-1515.
19. Fletcher BR, Baxter MG, Guzowski JF, Shapiro ML y Rapp RR, 2007. Selective cholinergic depletion of the hippocampus spares both behaviorally induced arc transcription and spatial learning and memory. *Hippocampus.* 17, 227-234.
20. Fogel S, Smith C y Beninger R. 2009. Evidence for a 2-step model of sleep and memory: Learning-dependent changes in spindles and theta in rats. *Brain Res Bull.* 79, 445-451.
21. Fukazawa Y, Saitoh Y, Ozawa F, Ohta Y, Mizuno K y Inokuchi K. 2003. Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the dendritic spine that is essential for late LTP maintenance *in vivo*. *Neuron.* 38, 447-460.
22. Fuster J. 1997. Network memory. *Trends Cog. Sci.* 10, 451-459.
23. Giovannini MG, Rakovska A, Benton RS, Pazzagli M, Bianchi L y Pepeu G. 2001. Effects of novelty and habituation on acetylcholine, GABA, and glutamate release from the frontal cortex and hippocampus of freely moving rats. *Neuroscience.* 106, 43-53.
24. Guevara MA, Ramos J, Hernández-González M, Zarabozo D y Corsi-Cabrera M. 2003. POTENCOR: a program to calculate power and correlation spectra of EEG signals. *Comput. Methods Programs Biomed.* 72, 241-250.
25. Guzowski JF, McNaughton BL, Barnes CA y Worley PF. 1999. Environment-specific expression of the immediate-early gene Arc in hippocampal neuronal ensembles. *Nat. Neurosci.* 2, 1120-1124.

26. Guzowski JF. 2002. Insights into immediate-early gene function in hippocampal memory consolidation using antisense oligonucleotide and fluorescent imaging approaches. *Hippocampus*. 12, 86-104.
27. Guzowski JF, Miyashita T, Chawla MK, Sanderson J, Maes LI, Houston FP, Lipa P, McNaughton BL, Worley PF, y Barnes CA. 2006. Recent behavioral history modifies coupling between cell activity and Arc gene transcription in hippocampal CA1 neurons. *Natl Acad Sci U S A*. 103, 1077-1082.
28. Hasselmo M. 2005. What is the function of hippocampal theta rhythm? - Linking behavioral data to phasic properties of field potential and unit recording data. *Hippocampus*. 15, 936-949.
29. Hebb D. 1949. *Organization of behavior*. Wiley, New York.
30. Henze DA, Wittner L y Buzsaki G. 2002. Single granule cells reliably discharges in the hippocampal CA3 network *in vivo*. *Nat. Neurosci*. 5, 790-795.
31. Huang F, Chotiner JK y Steward O. 2007. Actin polymerization and ERK phosphorylation are required for Arc/Arg 3.1 mRNA targeting to activated synaptic sites on dendrites. *J. Neurosci*. 27, 9054-9067.
32. Jarrard LE. 1983. Selective hippocampal lesions and behavior: effects of kainic acid lesions on performance of place and cue tasks. *Behav Neurosci*. 97, 873-889.
33. Karni A y Sagi D. 1993. The time course of learning a visual skill. *Nature*, 365, 250-252.
34. Kesner RP, Lee I y Gilbert PE. 2004. A behavioral description of hippocampal function based on a subregional analysis. *Rev. Neurosci*. 15, 333-351.
35. Kocsis B, Bragin A y Buzsáki G. 1999. Interdependence of multiple theta generators in the hippocampus: a partial coherence analysis. *J. Neurosci*. 19, 6200-6212.
36. Kubik S, Miyashita T y Guzowski JF. 2007. Using immediate-early genes to map hippocampal subregional functions. *Learn. Mem*. 14, 758-770.
37. Kwag J y Paulsen O. 2009. The timing of external input controls the sign of plasticity at local synapses. *Nat. Neurosci*. 12, 1219-21.
38. Lamprecht R y LeDoux JE. 2004. Structural plasticity and memory. *Nat. Rev. Neurosci*. 5, 45-54.
39. Lanahan A. y Worley P. 1998. Immediate-early genes and synaptic function. *Neurobiol. Learn. Mem*. 70, 37-43.

40. Lassalle JM, Bataille T y Halley H. 2000. Reversible inactivation of the hippocampal mossy fiber synapses in mice impairs spatial learning, but neither consolidation nor memory retrieval, in the Morris navigation task. *Neurobiol. Learn. Mem.* 73, 243-57.
41. Lee MG, Chrobak JJ, Sik A, Wiley RG y Buzsaki G. 1994. Hippocampal theta activity following selective lesion of the septal cholinergic system. *Neuroscience.* 1033-1047.
42. Lee I. y Kesner RP. 2004. Encoding versus retrieval of spatial memory: Double dissociation between the dentate gyrus and the perforant path input into CA3 in the dorsal hippocampus. *Hippocampus.* 14, 66-76.
43. Lee I, Hunsaker MR y Kesner RP. 2005. The role hippocampal subregions in detecting spatial novelty. *Behav. Neurosci.* 119, 145-153.
44. Leutgeb S, Leutgeb JK, Barnes CA, Moser EI, McNaughton BL y Moser MB 2005. Independent Codes for Spatial and Episodic Memory in Hippocampal Neuronal Ensembles. *Science.* 309, 619-623.
45. Link W, Konietzko UW, Kauselmann G, Krug M, Schwanke B, Frey U y Kuhl D. 1995. Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. *Natl. Acad. Sci. U S A.* 92, 5734-5738.
46. Lyford GL, Yamagata K, Kaufmann WE, Barnes CA, Sanders LK, Copeland GK, Gilbert DJ, Jenkins NA, Lanahan AA, y Worleyz PF. 1995. *Arc*, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron.* 14, 433-445.
47. Marr D. 1971. Simple memory: a theory for archicortex. *Phi- los. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol.* 262, 23-81.
48. McIntyre CK, Miyashita T, Setlow B, Marjon KD, Steward O, Guzowski JF, y McGaugh JL. 2005. Memory-influencing intra-basolateral amygdala drug infusions modulate expression of *Arc* protein in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 102, 10718–10723.
49. McNaughton BL, Barnes CA, Meltzer J, Sutherland RJ. 1989. Hippocampal granule cells are necessary for normal spatial learning but not for spatially-selective pyramidal cell discharge. *Exp Brain Res.* 76, 485-96.
50. McGaugh JL. 2000. Memory- A century of consolidation. *Science* 287, 248-251.
51. Messaoudi E, Kanhema T, Soulé J, Tiron A, Dageyte G, da Silva B y Bramham CR. 2007. Sustained *Arc/Arg3.1* synthesis controls long-term potentiation consolidation through regulation of local actin polymerization in the dentate gyrus *in vivo*. *J. Neurosci.* 27, 10445–10455.

52. Moga DE, Calhoun ME, Chowdhury A, Worley P, Morrison JH y Shapiro ML. 2004. Activity-regulated cytoskeletal-associated protein is localized to recently activated excitatory synapses. *Neuroscience*. 125, 7-11.
53. Montgomery SM, Sirota A y Buzsáki G. 2008. Theta and Gamma Coordination of Hippocampal Networks during Waking and Rapid Eye Movement Sleep. *J. Neurosci*. 28, 6731-6741.
54. Montgomery SM, Betancur MI y Buzsáki G. 2009. Behavior-dependent coordination of multiple theta dipoles in the hippocampus. *J. Neurosci*. 29, 1381-94.
55. Muller RU y Kubie JL. 1987. The effect of changes in the environment on the spatial firing of hippocampal complex-spike cells. *J. Neurosci*. 7, 1951-1968.
56. Paxinos G y Watson C. 1998. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, New York, NY.
57. O'Keefe J. y Dostrovsky J. 1971. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res*. 34, 171-175.
58. Olvera-Cortés E., Cervantes M y González-Burgos I. 2002. Place-learning, but not cue-learning training, modifies the hippocampal theta rhythm in rats. *Brain Res Bull*. 58, 261–270.
59. Olvera-Cortés E, Guevara MA y González-Burgos I. 2004. Increase of the hippocampal theta activity in the morris water maze reflects learning rather than motor activity. *Brain Res. Bull*. 62: 379-384.
60. Orr G, Rao G, Houston FP, McNaughton BL, Barnes CA. 2001. Hippocampal synaptic plasticity is modulated by theta rhythm in the fascia dentata of adult and aged freely behaving rats. *Hippocampus*. 11, 647-654.
61. Pavlides C, Greenstein YJ, Grudman M, Winson J. 1988. Long-term potentiation in the dentate gyrus is induced preferentially on the positive phase of theta-rhythm. *Brain Res*. 439, 383–387.
62. Petsch H., Stumpf, C. and Gogolák, G., 1962. The significance of the rabbit's septum as a relay station between midbrain and the hippocampus: I. The control of hippocampus arousal activity by the septum cells. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol*. 14, 202–211
63. Plath N, Ohana O, Dammermann B, Errington ML, Schmitz D, Gross C, Mao X, Engelsberg A, Mahlke C, Welzl H, Kobalz U, Stawrakakis A, Fernandez E, Waltereit R, Bick-Sander A, Therstappen E, Cooke SF, Blanquet V, Wurst W, Salmen B, Bösl MR, Lipp HP, Grant SG, Bliss TV,

- Wolfer DP y Kuhl D. 2006. Essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. *Neuron*. 52, 437-444.
64. Ramírez-Amaya V, Vazdarjanova A, Mikhael D, Rosi S, Worley PF y Barnes CA. 2005. Spatial Exploration-Induced Arc mRNA and Protein Expression: Evidence for Selective, Network-Specific Reactivation. *J. Neurosci*. 25,1761-1768.
 65. Rial Verde EM, Lee-Osbourne J, Worley PF, Malinow R, Cline HT. 2006. Increased expression of the immediate-early gene arc/arg3.1 reduces AMPA receptor-mediated synaptic transmission. *Neuron*. 52, 461-74.
 66. Ribeiro S, Goyal V, Mello CV y Pavlides C. 1999. Brain gene expression during REM sleep depends on prior waking experience. *Learn. Mem.* 6, 500-508.
 67. Ribeiro S, Mello CV, Velho T, Gardner TJ, Jarvis ED y Pavlides C. 2002. Induction of hippocampal long-term potentiation during waking leads to increased extrahippocampal zif-268 expression during ensuing rapid-eye-movement sleep. *J. Neurosci*. 22, 10914-10923.
 68. Ribeiro S y Nicolelis MAL. 2004. Reverberation, Storage and Post-Synaptic Propagation of Memories During Sleep. *Learn. Mem.* 11, 686–696.
 69. Ribeiro S, Shi X, Engelhard M, Zhou Y, Gervasoni D, Lin S-C, Zhang H, Wada K y Nicolelis MAL. 2007. Novel experience induces persistent sleep-dependent plasticity in the cortex but not in the hippocampus. *Frontiers in Neurosci*. 1, 43-55.
 70. Rolls ET. 1996. A theory of hippocampal function in memory. *Hippocampus*. 6, 601-620.
 71. Rolls ET y Kesner R. 2006. A computational theory of hippocampal function, and empirical tests of the theory. *Prog. Neurob.* 79, 1-48.
 72. Scoville WB y Milner B. 1957. "Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions". *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 20, 11–21.
 73. Shepherd JD, Rumbaugh G, Wu J, Chowdhury S, Plath N, Kuhl D, Huganir RL, Worley PF. 2006. Arc/Arg3.1 mediates homeostatic synaptic scaling of AMPA receptors. *Neuron*. 52, 475-84.
 74. Shirvalkar PR y Bahar AS. 2009. The Multiple Origins and Laminar Topography of the Hippocampal Theta Rhythm. *J. Neurosci*. 29, 7111-7113.
 75. Sirota A y Buzsáki G. 2005. Interaction between neocortical and hippocampal networks via slow oscillations. *Thalamus Relat Syst.* 3, 245-259.
 76. Steward O, Wallace CS, Lyford GL y Worley PF. 1998. Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. *Neuron*. 21, 741-751.

77. Straube T, Korz V, Balschun D y Frey JU. 2003. Requirement of beta-adrenergic receptor activation and protein synthesis for LTP-reinforcement by novelty in rat dentate gyrus. *J. Physiol.* 552, 953-960.
78. Takana J, Horiike Y, Matsuzaki M, Miyazaki T, Ellis-Davies GCR y Kasai H. 2008. Protein synthesis and neurotrophin-dependent structural plasticity of single dendritic spines. *Science.* 319, 1683-1687.
79. Teber I, Köhling R, Speckmann EJ, Barnekow A, Kremerskothen J. Muscarinic acetylcholine receptor stimulation induces expression of the activity-regulated cytoskeleton-associated gene (ARC). *Brain Res Mol Brain Res.* 121, 131-136.
80. Tischmeyer W. y Grimm R. 1999. Activation of immediate early genes and memory formation. *Cell. Mol. Life Sci.* 55, 564-574.
81. Treves A. y Rolls ET. 1992. Computational constraints suggest the need for two distinct input systems to the hippocampal CA3 network. *Hippocampus.* 2, 189-199.
82. Treves A y Rolls ET. 1994. Computational analysis of the role of the hippocampus in memory. *Hippocampus.* 374-391.
83. Tolman EC. 1948. "Cognitive maps in rats and men". *Psychol. Rev.* 55, 189–208.
84. Tsanov M y Manahan-Vaughan D. 2009. Long-term plasticity is proportional to theta-activity. *PLoS One.* 4(6): e5850. doi:10.1371/journal.pone.0005850.
85. Vanderwolf CH. 1969. Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. *EEG Clin Neurophysiol* 26, 407–418.
86. Vanderwolf CH y Baker GB. 1986. Evidence that serotonin mediates noncholinergic low voltage fast activity, noncholinergic hippocampal rhythmical slow activity and contributes to intelligent behaviour. *Brain Res.* 374, 342-356.
87. Vanderwolf CH. 1988. Cerebral activity and behaviour: control by central cholinergic and serotonergic systems. *Int. Rev. Neurobiol.* 30, 255-325.
88. Vankov A, Hervé-Minvielle A y Sara SJ. 1995. Response to novelty and its rapid habituation in locus coeruleus neurons of the freely exploring rat. *Eur. J. Neurosci.* 7, 1180-1187.
89. Vazdarjanova A, McNaughton BL, Barnes CA, Worley PF y Guzowski JF. 2002. Experience-dependent coincident expression of the effector immediate-early genes arc and Homer 1a in hippocampal and neocortical neuronal networks. *J. Neurosci.* 22, 10067–10071.

90. Vinogradova OS. 1995. Expression, control and probable functional significance of neuronal theta rhythm. *Prog. Neurobiol.* 45, 523-583.
91. Vyazovskiy VV, Cirelli C, Pfister-Genskow M, Faraguna U y Tononi G. 2008. Molecular and electrophysiological evidence for net synaptic potentiation in wake and depression in sleep. *Nat Neurosci.* 11, 200-208.
92. Wilson MA y McNaughton BL. 1993. Dynamics of the hippocampal ensemble code for space. *Science.* 261, 1055-1058.
93. Winson J. 1978. Loss of hippocampal theta rhythm results in spatial memory deficit in the rat. *Science.* 14, 160-3.
94. Xavier GF, Oliveira-Filho FJB y Santos AGM. 1999. Dentate gyrus-selective colchicine lesion and disruption of performance in spatial tasks: difficulties in "place strategy" because of a lack of flexibility in the use of environmental cues? *Hippocampus.* 9, 668-681.
95. Yoder RM y Pang KC. 2005. Involvement of GABAergic and cholinergic medial septal neurons in hippocampal theta rhythm. *Hippocampus.* 15, 381-392.

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1- Célula de lugar.....	2
Figura 2- Potenciación de largo plazo.....	3
Figura 3- Arc en dendritas.....	6
Figura 4- Dinámica temporal de la expresión de Arc.....	9
Figura 5- Expresión de Arc en CA1, CA3 y Corteza.....	11
Figura 6- Expresión de Arc en el giro dentado asociada a la exploración....	12
Figura 7- Actividad theta hipocampal.....	19
Figura 8- Diagrama experimental.....	29
Figura 9- Bloqueo.....	32
Figura 10- Cortes de cerebro.....	32
Figura 11- Expresión de la proteína Arc en el giro dentado.....	34
Figura 12- Dinámica temporal de Arc.....	35
Figura 13- Expresión de Arc a las 8 horas después de la exploración.....	36
Figura 14- Actividad de campo local.....	38
Figura 16- Sueño MOR (GD).....	40
Figura 17- Sueño MOR sub-bandas theta (GD).....	41
Figura 18- sueño de onda lenta (GD).....	42
Figura 19- Conductas motoras (GD).....	43
Figura 20.- Atento-quieto (GD).....	44
Figura 21.- Sueño MOR (CA3).....	45
Figura 22.- Sueño MOR, sub-bandas (CA3).....	45
Figura 23.- Sueño de onda lenta (CA3).....	46
Figura 24.- Sueño de onda lenta, sub-bandas (CA3).....	47
Figura 25.- Conductas Motoras (CA3).....	47
Figura 26.- Atento-Quieto (CA3).....	48