



---

---

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

“LAS NUEVAS NEURONAS GRANULARES DEL HIPOCAMPO EN EL  
PROCESAMIENTO DE INFORMACIÓN EN LA EVOCACIÓN DE UNA MEMORIA  
REMOTA O RECIENTE DE RECONOCIMIENTO DE OBJETOS”

TESIS

Que para obtener el grado académico de

Maestra en Ciencias (Neurobiología)

PRESENTA

**Biol. Paola Cristina Bello Medina**

Director de Tesis: Dr. Víctor Ramírez Amaya

Campus Juriquilla, Querétaro, Agosto de 2011





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 Sinodal certificamos que la tesis elaborada por: Paola Cristina Bello Medina, cuyo título es: “Las nuevas neuronas granulares del hipocampo en el procesamiento de información durante la evocación de una memoria de reconocimiento de objetos remota o reciente” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

---

Dra. Martha Lilia Escobar Rodríguez  
Presidente

---

Dr. Víctor Ramírez Amaya  
Secretario

---

Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez  
Vocal

---

Dr. Roberto Agustín Prado Alcalá  
Suplente

---

Dr. Fernando Peña Ortega  
Suplente

Aprobado por el Comité Académico

---

Coordinador del Programa

## RESUMEN

Modelos computacionales sugieren que la neurogénesis que ocurre en el giro dentado (GD) del hipocampo en el adulto incrementa la eficiencia del procesamiento de la información en la red neuronal, durante la evocación de una memoria reciente (Weisz y Argibay, 2009). Se puede determinar el papel del GD en la tarea de reconocimiento de objetos (TRO), mediante la expresión de la proteína *Arc* en células NeuN/BrdU+ y NeuN+ después de una prueba de memoria reciente (24 h) o remota (7 d). A las ratas se les administró BrdU (200mg/kg) i.p. durante 7 d, la conducta inició 45d después de la última inyección de BrdU. La adquisición de TRO fue en 5 sesiones, una diaria de 10min. En cada sesión, se expusieron 3 objetos (A,B,C) ubicados aleatoriamente. En la prueba de retención, se reemplazó un objeto familiar por un objeto novedoso (A,Y,C), se hicieron 3 pruebas de 3min. Los resultados muestran que TRO se ejecuta eficientemente a las 24h y a los 7d. Se encontró que las nuevas neuronas granulares del GD expresan *Arc* en mayor proporción en una prueba de memoria reciente (24 h) con objeto familiar; además, estas nuevas neuronas se activan en la SGZ específicamente para la TRO, asimismo, en la capa 2 se procesa información espacial y familiar de la TRO, lo cual muestra una regionalización en la activación de las nuevas células granulares.

Encontramos una correlación inversamente proporcional entre el número de nuevas neuronas granulares activadas expresando *Arc* y la eficiencia en la ejecución de la TRO, es decir, a mayor proporción de nuevas neuronas activadas menor es la eficiencia de los animales para ejecutar la TRO, lo cual puede sugerir que estas nuevas neuronas están generando ruido en el procesamiento de información de una memoria de reconocimiento de objetos en el GD.

## SUMMARY

Currently, it is well accepted that hippocampal neurogenesis occurs in adult mammals, but it remains a challenge for neuroscientist to explain the functional significance of these new neurons for hippocampal information processing. A computational model suggested that new neurons increase the efficiency of recent memory retrieval allowing proper discrimination. To evaluate this hypothesis, we trained previously *BrdU* injected animals in a 3 object recognition task (ORT), perform through a 5 days in which all objects were located in different positions in each daily session. Animals showed stable memory from 24 to 168 hours after. One hour after the memory test, with either familiar or non-familiar object presentation, the animals were sacrificed and their brains processed for NeuN-Arc-BrdU triple immunohistochemistry. Confocal images were taken and analyzed in order to count the number of adult born neurons activated by the behavioral experience. We found that adult born granule neurons expressing Arc protein were found in a greater proportion in animals tested in the recent memory test with a familiar object. Activated adultborn neurons were found in the SGZ after ORT experience, contrasting with previous findings using spatial exploration. After ORT experience, more neurons were activated in DG layer 3, when spatial exploration experience activates neurons primarily in layers 1 and 2. Finally, the correlation analysis between behavioral performance and the number of adult born neurons recruited in the network revealed a highly significant negative correlation, suggesting that as more new neurons are recruited, the animal's performance in the ORT task decreases.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Neurobiología, en especial a mi tutor, el *Dr. Víctor Ramírez-Amaya* por darme la oportunidad de entrar a su laboratorio a desarrollar un proyecto que suscita un mayor grado de curiosidad e iniciativa, cuyo fin es aportar conocimiento para el entendimiento de las dinámicas cerebrales, que constituyen una realidad enigmática.

Mi comité tutor, el *Dr. Roberto Prado Alcalá*, el *Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina* por sus valiosos aportes y orientación en el desarrollo de este proyecto de investigación.

A la *Dra. Gina Lorena Quirarte* por su amable colaboración académica y personal; sobre todo por introducirme teóricamente en mundo del aprendizaje y la memoria.

A la *Dra. Livia Sanchez (y a Antonio)*, por sus valiosas contribuciones y opiniones en el desarrollo de los controles experimentales de la tarea de reconocimiento de objetos utilizadas en esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio *Jimena, Edgar, Damaris, Rafael, Mariana, Nadia* por su apoyo incondicional, el aporte cognoscitivo y la fuerza impartida en diferentes momentos de estos dos años de trabajo dentro del mismo ambiente.

A *Cutberto Dorado* y *Carlos Lozano* por el apoyo técnico que fue vital para el desarrollo de este proyecto de investigación.

A *Leonor Casanova* por toda la colaboración y apoyo otorgado a la hora de resolver dudas e inquietudes.

A la **Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM**  
Becario N°: 510450081

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT**, por auspiciar proyecto: 130802  
Por asignación de beca al Becario N°: 234103

Al PAPIIT, por auspiciar el proyecto: Ref. IN216510-22

Al personal del departamento de análisis de imágenes digitales  
Ing. *Elsa Nydia Hernández Ríos*

Al personal de la Biblioteca  
*M.V.Z. Román Pacheco Barrita*  
*Lic. Ángel Salazar Muro*  
*Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela*

El personal de Bioterio  
*M.V.Z. Martín García Servín*

Al personal de enseñanza  
*Dra. Teresa Morales Guzmán*  
*M. en C. Leonor Casanova Rico*

A la Unidad de Videoconferencia  
*María de Lourdes Lara A.*

## DEDICATORIA

*A mis padres Héctor y Gladys, en general a toda mi familia por el apoyo infundido y por toda la educación que me ha sido otorgada.*

*En especial a mis hermanitos Giovanni, Stivell, Alexander, para que puedan seguir adelante con grandes metas trazadas y que el ejemplo que ahora les estoy dando sea superado por sus logros personales, académicos y profesionales.*

*A todas las personas que confiaron en mí para la ejecución de este proyecto, el cual es un eslabón más para la obtención de conocimiento en el mundo de la ciencia.*

*“Algunos hombres se precipitan hacia la luz, no para ver mejor sino para brillar  
(Nietzsche)”.*

*Paola Cristina Bello Medina*

*A mi colega, compañero, amigo y novio:*

*A Diego Alexander Gonzalez Franco*

*Por todo el apoyo, la fortaleza  
y todo el cariño  
que me ha dado en este  
largo camino recorrido.*

## ABREVIATURAS

GD	Giro dentado en el hipocampo
SGZ	Zona subgranular del giro dentado
CA	Cuernos de Ammon
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridine
Arc	Activity-regulated cytoskeleton-associated protein
NeuN	Neuronal nuclei
ADN	Ácido desoxirribonucleico
CREB	cAMP response element-binding
TRO	Tarea de reconocimiento de objetos
LTP	Potenciación a largo plazo, del inglés Long-term potentiation
AMPA	Ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
GEITs	Genes de expresión inmediata temprana

# ÍNDICE

	Pág.
• <b>RESUMEN</b> .....	<b>III</b>
• <b>SUMMARY</b> .....	<b>IV</b>
• <b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>V</b>
• <b>DEDICATORIA</b> .....	<b>VII</b>
• <b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>VIII</b>
• <b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
• <b>ANTECEDENTES</b>	
1. Aprendizaje y memoria.....	<b>2</b>
2. Hipocampo.....	<b>4</b>
2.1 Plasticidad sináptica.....	<b>7</b>
2.1.1 Potenciación a largo plazo.....	<b>7</b>
2.2 Genes de expresión inmediata temprana.....	<b>11</b>
2.2.1 Proteína asociada al citoesqueleto regulada por actividad ( <i>Arc/Arg3.1</i> ).....	<b>11</b>
3. Neurogénesis en el hipocampo.....	<b>13</b>
3.1 Proliferación e integración anatómica de las nuevas neuronas granulares.....	<b>14</b>
3.2 Integración funcional de las nuevas neuronas a la red hipocampal.....	<b>16</b>
4. Procesamiento de información en las nuevas células granulares del hipocampo.....	<b>19</b>
4.1 Modelo computacional de Weisz y Argibay.....	<b>21</b>
4.2 Inhibición de la proliferación de las nuevas neuronas en el hipocampo.....	<b>23</b>
5. Tarea de reconocimiento de objetos.....	<b>24</b>
5.1 Tarea de reconocimiento de objeto novedoso.....	<b>25</b>
5.2 Tarea de reconocimiento de objetos dependiente de lugar.....	<b>26</b>
5.3 Papel del hipocampo en la tarea de reconocimiento de objetos.....	<b>26</b>
• <b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>30</b>
• <b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>31</b>
• <b>OBJETIVOS</b> .....	<b>32</b>
• <b>SUJETOS, MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
1. Administración de <i>BrdU</i> .....	<b>33</b>
2. Tarea de reconocimiento de objetos.....	<b>34</b>

3. Sacrificio y extracción de cerebro.....	36
4. Bloqueo.....	36
5. Criosección.....	37
6. Inmunohistoquímica.....	38
7. Mosaic X con el Apotome.....	39
8. Análisis estadístico.....	41
• <b>PROTOSCOLOS</b>	
<b>Experimento 1.</b> Estandarización de la dosis de BrdU.....	41
<b>Experimento 2.</b> Estandarización de la tarea de reconocimiento de objetos.....	42
<b>Experimento 3.</b> Cuadrado latino: tarea de reconocimiento de objetos.....	43
<b>Experimento 4.</b> Incorporación de las nuevas células granulares en la red hipocampal en la evocación de una memoria reciente y remota en la tarea de reconocimiento de objetos.....	44
• <b>RESULTADOS</b>	
<b>Experimento 1.</b> Estandarización de la dosis de BrdU.....	46
<b>Experimento 2.</b> Estandarización de la tarea de reconocimiento de objetos.....	47
<b>Experimento 3.</b> Cuadrado latino: Tarea de reconocimiento objetos.....	50
<b>Experimento 4.</b> Incorporación de las nuevas células granulares en la red hipocampal en la evocación de una memoria reciente y remota en la tarea de reconocimiento de objetos.....	51
<b>Resultados conductuales.....</b>	51
Adquisición TRO.....	51
Prueba de retención TRO.....	52
Adquisición por sujeto experimental.....	53
Prueba de retención por sujeto experimental.....	56
<b>Resultados histológicos.....</b>	59
Expresión de la proteína de <i>Arc</i> en las células granulares totales del GD.....	59
Células granulares positivas a <i>NeuN/BrdU</i> en el GD.....	62
Células granulares positivas a <i>NeuN/BrdU</i> que expresan la proteína de <i>Arc</i> .....	63
Correlación entre el número de neuronas granulares BrdU+/Arc+ y la eficiencia en la ejecución de la tarea de reconocimiento de objetos.....	66
• <b>DISCUSIÓN.....</b>	68
• <b>CONCLUSIONES.....</b>	76

- **REFERENCIAS.....78**
- **ÍNDICE DE FIGURAS.....85**
- **ÍNDICE DE TABLAS.....87**
- **APÉNDICES.....88**

## INTRODUCCIÓN

Con el descubrimiento de la producción de nuevas neuronas en el cerebro adulto de mamíferos, se ha seguido un arduo camino en la búsqueda de detalles que caractericen los procesos de proliferación, sobrevivencia e integración de estas nuevas neuronas. Hay dos regiones en el cerebro del mamífero adulto donde se puede observar neurogénesis, éstas son el bulbo olfatorio y el hipocampo. El estudio de la neurogénesis hipocampal es de interés particular, ya que esta estructura está involucrada en el procesamiento de información multimodal que permite la formación de memorias episódicas, siendo la memoria espacial el ejemplo más prominente.

Con el propósito de entender el papel de las neuronas que nacen en el animal adulto, en el procesamiento de la información episódica, se han propuesto modelos computacionales que incluyen a la neurogénesis y su papel en el procesamiento de información de dicha red. En un reciente modelo computacional (Weisz y Argibay, 2009), en el que se utilizó la arquitectura de la red neuronal semejante a la de modelos que han tenido éxito para la generación de respuesta de células de lugar (McNaughton y Morris, 1987; Treves y Roll, 1994) y que incluía parámetros de la escasez del código neuronal en el giro dentado (GD) partiendo de determinaciones que se han hecho a partir de la caracterización de la actividad neuronal inducida por la conducta usando la detección del gen de expresión inmediata *Arc* (Ramírez-Amaya et al., 2005; Chawla et al., 2005). Lo más sobresaliente del modelo de Weisz y Argibay, es que evalúa la presencia o ausencia de neurogénesis, considerando que ellas presentan una alta sensibilidad a la conducta (Ramírez-Amaya et al., 2006; Kee et al., 2007) y una alta capacidad plástica (Schmit-Hieber et al., 2004). Con estas características, los resultados de la operación del modelo computacional mostraron que la adición de nuevas neuronas con una sensibilidad diferente, otorgan a la red hipocampal una mayor eficiencia en el procesamiento de información mnémica reciente, pero no así en el procesamiento de información mnémica remota (Weisz y Argibay, 2009). Dado que la tarea de reconocimiento de objetos puede ser lograda en un solo ensayo y es considerada memoria episódica (Mayes et al., 2001), este proyecto plantea evaluar la participación de las nuevas neuronas en el procesamiento de información episódica reciente y comparar con el procesamiento de información episódica remota, mediante el análisis neuroanatómico de la actividad neuronal, utilizando la detección de la expresión de la proteína del gen de expresión inmediata *Arc*, en las células nuevas maduras que se activan durante la tarea de reconocimiento de objetos.

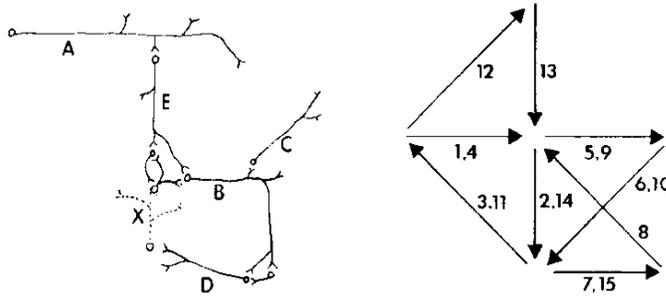
## ANTECEDENTES

### 1. Aprendizaje y memoria

Diferentes capacidades y habilidades determinan la posibilidad de los organismos para adaptarse al medio ambiente y garantizar su supervivencia y la de su especie. La adaptación que pueda alcanzar un organismo en el medio ambiente en el que vive se ve constantemente modificada por el tipo de información que adquiere y almacena en las interacciones con estímulos que son percibidos en el medio circundante. Sin embargo, esta información es codificada y transmitida a centros de integración y de almacenaje especializados en el sistema nervioso.

Algunas ideas se han direccionado a la existencia de un mecanismo por el cual se procesa la información que involucra redes neuronales que pueden trabajar en serie o en paralelo, formando circuitos cuya actividad se induce por estímulos específicos y que son capaces de establecer y mantener representaciones de los mismos y por ende afectar y determinar la conducta de un organismo (Sakurai, 1999).

Es evidente que las neuronas con su actividad eléctrica, son unidades de procesamiento de información que dan lugar a la propiedad emergente en los procesos cognoscitivos. Sin embargo, la variabilidad de disparo de una sola neurona, hace que sea inviable nombrar a la neurona como unidad básica del procesamiento de la información, en lugar de ello se considera un código poblacional. El psicólogo Donald Hebb en su libro *“La organización de la conducta”* (1949) planteó que el sistema nervioso procesa y codifica la información a través de los patrones de actividad eléctrica en grupos de neuronas que tienen la capacidad de reproducir dicho patrón de actividad, gracias a la existencia de circuitos recurrentes que permiten la reverberación de la actividad. Esto conlleva a una actividad sincrónica y cooperativa que da lugar a eventos de plasticidad sináptica, en donde se tiene la capacidad de reproducir estos patrones de actividad a lo largo de diferentes destinos temporales dependientes de las características de persistencia de los cambios en los pesos sinápticos que ocurrieron en este grupo de células a los cuales denominó *ensambles neuronales* (Fig. 1). De esta manera se puede inferir que son estos grupos neuronales los que representan la información provocando cambios muy finos y transitorios en el patrón de actividad eléctrica de cada neurona que se integra al ensamble.



**Figura 1.** Ensamble, conexiones sinápticas y conexiones recurrentes. En la sección izquierda de la figura se muestra un conjunto de neuronas en las que B, D y X representan conexiones recurrentes que conducen la estimulación hacia las mismas células de donde se originó, lo cual implica que el circuito puede *reverberar* por un tiempo. En la sección derecha de la figura se esquematiza un *ensamble*. Las flechas constituyen la dirección y los números, la secuencia de los potenciales de acción entre las neuronas del circuito. Con esto se logra mostrar la posibilidad de una alternancia en la reverberación por rutas en paralelo funcional, que permiten al ensamble mantenerse activo por más tiempo. Modificado de Hebb, 1949.

Para lograr que los ensambles puedan reproducir los patrones de actividad posteriormente Hebb planteó el postulado:

*“Cuando el axón de una célula A está lo suficientemente cercano a una célula B como para excitarla y repetida o persistentemente la excita, tiene lugar un proceso de crecimiento o cambio metabólico en una o ambas células, de tal forma que la eficiencia de A, como una de las diversas células que hacen disparar a B, aumenta”* (Hebb, 1949).

Esta propuesta sugiere que los cambios en la eficiencia sináptica son el mecanismo que permite estabilizar la capacidad de reproducir los patrones de actividad en los ensambles, lo cual permite el establecimiento de los patrones de actividad a largo plazo y así, el proceso celular que estabiliza la consolidación la información, es decir, formar una *memoria* (Bear, 1994).

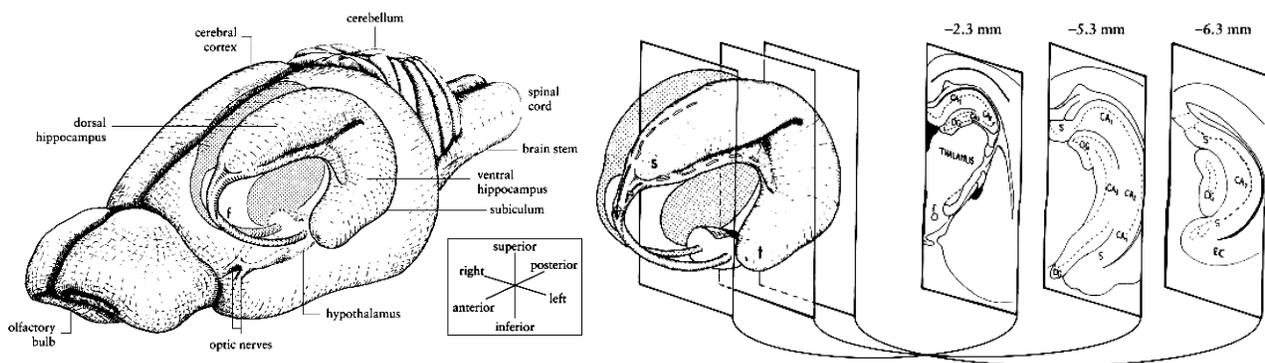
La mayoría de neurocientíficos aceptan la noción de que la representación de la información se da por medio de patrones de actividad que se repiten en grupos de células nerviosas, lo cual se conoce ampliamente como conexiones recurrentes (Fig. 1). Esta concepción se apoya en los resultados funcionales que proveen los modelos matemáticos y computacionales de redes neuronales (Marr, 1976), lo cual se ha ido complementando en la actualidad con trabajos basados en el análisis neurofisiológico y cognoscitivo (Sakurai, 1999).

Sin embargo, la memoria no es un proceso unitario (Hitch, 1984), está constituida por una alianza de diversos sistemas que interactúan sirviendo a diferentes funciones mnémicas que operan mediante circuitos neuroanatómicos y neuronales diferentes (Baddeley, 1988). Desde la

psicología cognitiva se han definido diferentes subsistemas mnémicos para caracterizar como se codifica la información, como se almacena. Además, se ha precisado que las tareas mnémicas varían de acuerdo a la clase de información adquirida (Zola-Morgan y Squire, 1993). No obstante, la memoria ha sido clasificada desde diferentes postulados teóricos (memoria primaria y secundaria, memoria a corto y largo plazo, memoria de trabajo, memoria declarativa y no declarativa, entre otros). Una nueva distinción conceptual que se ha enmarcado en la dimensión temporal de la amnesia retrograda, se refiere a la memoria reciente y remota (Delis, 1989). La información que se ha aprendido justamente antes de la lesión cerebral se considera como memoria reciente, mientras que el conocimiento que se adquiere años o décadas antes de la lesión cerebral se considera como memoria remota (Crosson, 1992; Delis, 1989). Esta dicotomía mnémica ayuda a caracterizar clínicamente la naturaleza de la amnesia retrógrada del paciente (Delis, 1989). Ocasionalmente, la distinción entre ambos términos se ha utilizado de forma sinónima a la memoria a corto y largo plazo (Barraquer-Bordas, 1992).

## 2. Hipocampo

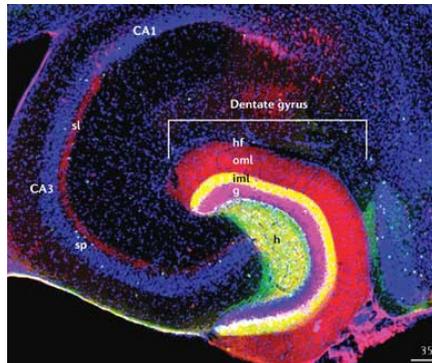
El hipocampo es una invaginación del giro parahipocampal localizado en el cuerno inferior del ventrículo lateral y consta de tres regiones: los cuernos de Ammon, el giro dentado (área dentada o fascia dentada) y el subículo (Fig. 2). El hipocampo, debe su nombre al vocablo griego *hippokampus* (“caballito de mar”), dado que su forma se asemeja.



**Figura 2.** Diagrama del hipocampo de rata. En el dibujo de la derecha se muestra la organización tridimensional del hipocampo y las estructuras relacionadas. En la derecha se muestran tres secciones coronales del lado izquierdo del hipocampo, con sus coordenadas en el eje antero-posterior con respecto a bregma. CA1, CA2, CA3: cuernos de Ammon, DG: giro dentado, EC: corteza entorrinal, f: fórnix, s: polo septal del hipocampo, S: subículo, t: polo temporal del hipocampo. Tomado de Foster *et al.*, 2006.

En 1933, el anatomista *Lorente de Nò* subdividió el cuerno de Amón en cuatro partes: CA1, CA2, CA3 y CA4. El giro dentado se divide en banda exterior y banda interior.

Ramón y Cajal (1893) describió siete láminas en el hipocampo, pero actualmente sólo se consideran tres diferentes estratos: *stratum moleculare*, *stratum lucidum* y *stratum oriens* (capa polimórfica) (Fig. 3).

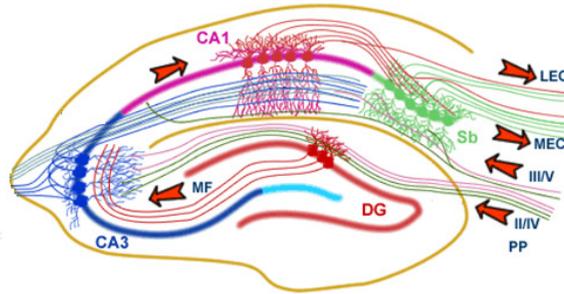


**Figura 3.** Corte horizontal de hipocampo de ratón. Se visualiza las diferentes capas del hipocampo de ratón por combinación de diferentes marcas fluorescentes. Las fibras musgosas de la región hilar (h), capa granular (g), capa molecular interna (iml), capa molecular externa (oml), fisura hipocámpica (hf), capa de células piramidales (sp), estrato lucidum (sl). Tomado de Foster *et al.*, 2006.

La población neuronal en el hipocampo incluye a las células piramidales (cuernos de Ammon), las células granulares (en el giro dentado), las células intrínsecas (células polimórficas, células de canasta), interneuronas GABAérgicas y a las células musgosas (ubicadas en el hilus).

El giro dentado y los CA constituyen esencialmente el circuito trisináptico del hipocampo (Fig. 4). Las aferentes de la corteza entorrinal buscan las dendritas de las células granulares en el giro dentado, donde se establece la primera sinapsis. Los axones de las células granulares forman las fibras musgosas, las cuales se conectan con las células piramidales de CA3, siendo ésta la segunda sinapsis.

Las neuronas piramidales de CA3 proyectan a CA1 formando la vía de colaterales de Schaffer, dando como resultado la tercera sinapsis. Las neuronas piramidales de CA1 proyectan su axón hacia el subículo, desde ahí retornan las proyecciones a la corteza entorrinal.



**Figura 4.** Formación hipocampal y sus principales aferencias. Línea rosada, fibras provenientes de la corteza entorrinal que conectan con las dendritas de las células granulares; eferencias: línea verde, fibras que retornan desde el subiculum hasta la corteza entorrinal; líneas rojas fibras musgosas que conectan las células granulares con las células piramidales de CA3, conservando la estructura trisináptica en el giro dentado. DG (Giro dentado), Sb (Subiculum), MF (Fibras musgosas), PP (Vía perforante), LEC (Corteza entorrinal lateral), MEC (Corteza entorrinal medial). Tomado de Foster *et al.*, 2006.

El giro dentado se ha dividido en cuatro capas: 1) la llamada *capa molecular* que está libre de células granulares, es donde proyectan las dendritas de las células granulares para hacer sinapsis con las fibras de la vía perforante, fibras axonales provenientes de la corteza entorrinal. También se encuentran algunas interneuronas y fibras de una variedad de entradas extrínsecas que terminan ahí, esta capa tiene un grosor de 250  $\mu\text{m}$  aproximadamente en la rata (Amaral *et al.*, 2007). 2) La principal capa de células, *la capa de células granulares*, está conformado por células granulares densamente empaquetadas, además se encuentran los somas de las células piramidales en canasta inmersos en esta capa cercanos al borde adyacente a la capa de células polimórficas (Fig. 4). El grosor de esta capa es equivalente a 60  $\mu\text{m}$  aproximadamente (Amaral *et al.*, 2007). La capa de células granulares se ha dividido en 3 capas de acuerdo a Esposito y cols (2005), las cuales se denominan capa 1 (inner), capa 2 (middle) y capa 3 (outer) a partir de la región interna del giro dentado (zona subgranular). La tercer capa de células corresponde a la *capa polimórfica*, la cual se encuentra constituida principalmente por las células musgosas cuya principal característica es la ausencia de mielina en sus axones, estas células representan una vía alterna que conecta al giro dentado con CA3 (Amaral *et al.*, 2007). La cuarta capa se denomina la zona subgranular es una banda estrecha de tejido adyacente al giro dentado. Se encuentra ubicada entre la capa de células granulares y el hilus (capa plexiforme o CA4). Descriptivamente la SGZ es definida como una capa cuyo grosor es de 20 a 25  $\mu\text{m}$ , también es ampliamente considerada como un nicho de proliferación celular siendo un microambiente permisivo donde se lleva a cabo la *neurogénesis hipocampal*, además contiene astrocitos con características de glía radial (Seri *et*

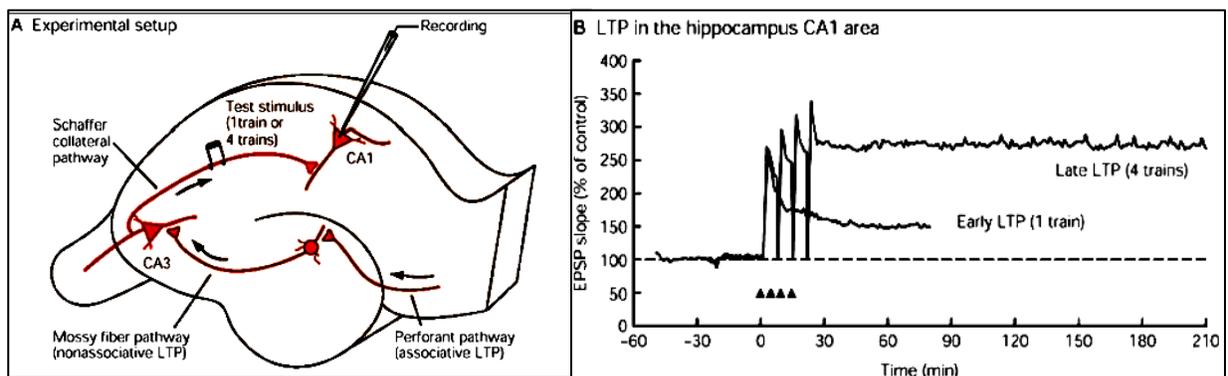
al., 2001), células troncales putativas de ésta región, diferentes tipos de progenitores gliales y neuronales.

## 2.1 Plasticidad sináptica

Se puede definir a la plasticidad sináptica como *cambios en la eficiencia sináptica que permiten el fortalecimiento de las conexiones funcionales entre neuronas* (Lynch, 2004). Ocurre a todos los niveles, desde las modificaciones en la funcionalidad de un canal iónico, hasta las características morfológicas de las neuronas, como es el caso de los cambios estructurales en las conexiones sinápticas (dinámica conformacional de espinas dendríticas) y en la dinámica entre células que conforman los circuitos, lo que incluye incluso neurogénesis como se verá más adelante. Estos cambios pueden persistir durante ventanas temporales que van en el orden de los milisegundos hasta por años.

### 2.1.1 Potenciación a largo plazo

La potenciación a largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés) se define como un aumento estable y duradero en la magnitud de la respuesta post-sináptica, después de que se han estimulado las vías aferentes mediante la administración de trenes de estimulación eléctrica de alta frecuencia (Bliss y Lomo, 1973). Este fenómeno plástico fue descrito inicialmente en la vía perforante (Fig. 5), que tiene aferencias en la corteza entorrinal y eferencias en el giro dentado y CA3.



**Figura 5.** LTP en el hipocampo. **A.** Montaje experimental en el estudio de la LTP en la región de CA1 del hipocampo. Las colaterales de Schaffer fueron estimuladas eléctricamente y la población de neuronas de piramidales es registrada. **B.** Comparación de la fase temprana y de la fase tardía de la LTP en una célula de la región CA1 del hipocampo. La gráfica muestra la tasa de aumento de los potenciales post-sinápticos excitatorios (PPSE) de la célula en función del tiempo. La pendiente es una medida de eficacia sináptica. Tomado de Bliss y Lomo, 1973.

El descubrimiento de la LTP demostró que durante el aprendizaje se producen cambios en las sinapsis que modifican su eficiencia como consecuencia de la estimulación.

La LTP se produce por la activación de los receptores a glutamato de tipo  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico (AMPA) y N-metil-D-aspartato (NMDA), que permiten la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$  al interior de la célula. Se requiere de la entrada de una fuerte cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  para inducir LTP.

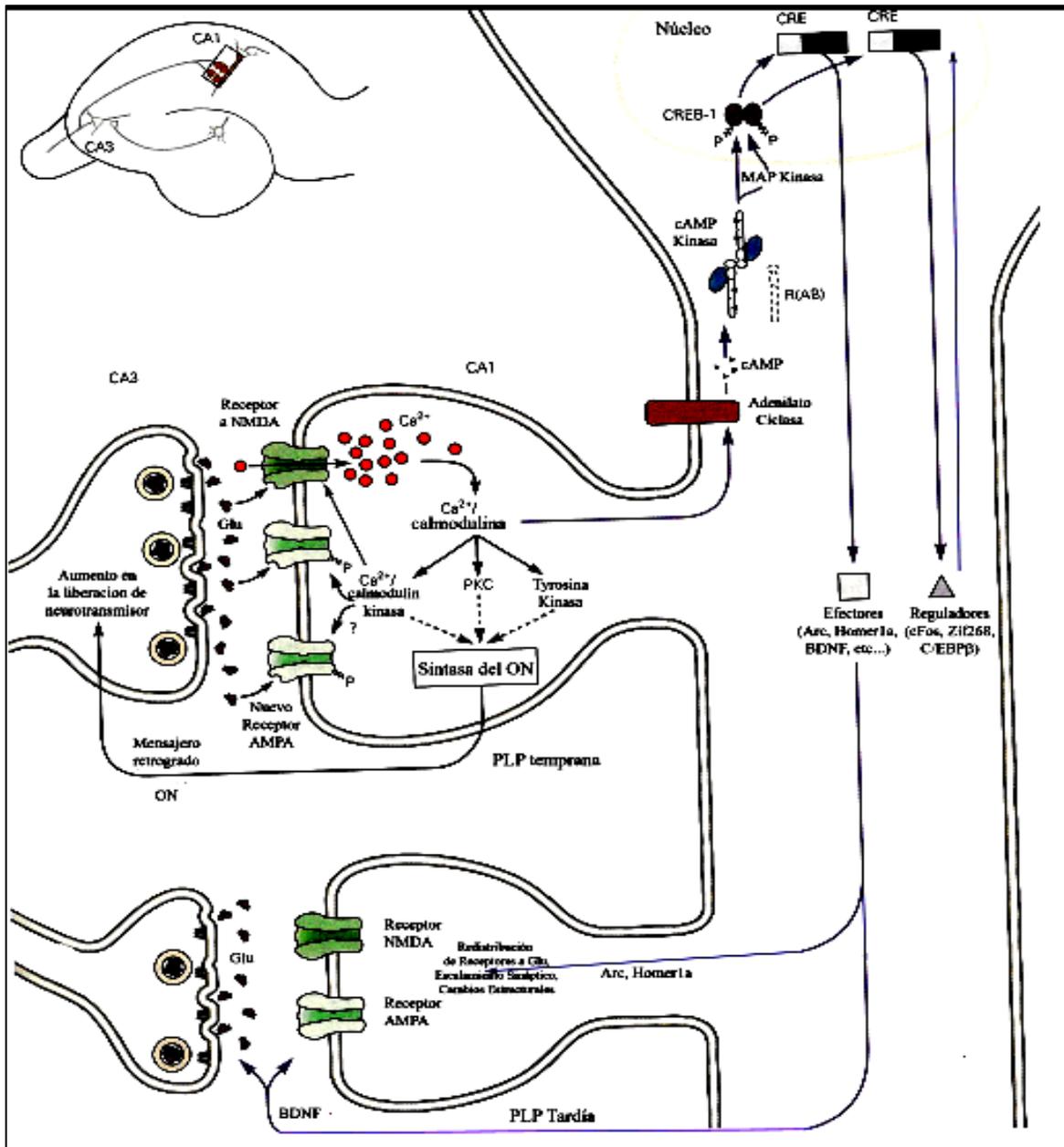
En la LTP la modificación en la eficiencia sináptica es dependiente de la actividad y se produce en un tiempo breve, que luego puede consolidarse y durar hasta por años (Thompson y Best, 1990). La LTP ha sido propuesta como modelo celular para explicar los mecanismos que subyacen el aprendizaje y la memoria, ya que refleja como los ensambles pueden establecer la capacidad de reproducir o dar lugar a la modificación de los patrones de actividad a largo plazo.

Los eventos moleculares que ocurren como consecuencia de la activación de receptores a NMDA, dan lugar a cambios plásticos tempranos y tardíos (Fig. 6). Al activarse los receptores a NMDA se permite la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , que provoca la activación de diferentes cinasas como la CaMKII, proteína cinasa C (PKC) o la tirosina cinasa. Al activarse éstas, fosforilan diferentes proteínas de membrana entre las que se incluyen los mismos receptores AMPA y NMDA que cambian sus características funcionales y la eficiencia de la respuesta post-sináptica (Kandel, 2001).

Estos eventos dan lugar a las modificaciones plásticas tempranas, ya que ocurren casi de inmediato y tienden a ser transitorios. Los eventos plásticos tardíos también son regulados por las señales de calcio, pero implican la transcripción de genes y la activación de segundos mensajeros como el AMP cíclico. Este funciona como un importante segundo mensajero, cuya actividad regula a otras cinasas como es el caso de la protein cinasa A (PKA) que a su vez regulan la actividad de proteínas que regulan la transcripción de genes, como la activación de factores de transcripción como CREB (Kandel et al. 2001).

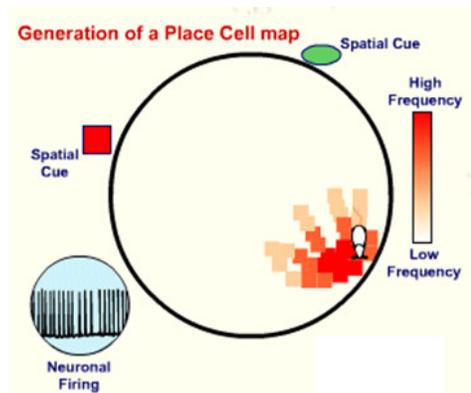
Además de la evidencia que pueda aportar la LTP y los mecanismos que subyacen a ésta en el hipocampo, esta estructura recibe información multimodal de la corteza cerebral a través de la

corteza entorrinal, la evidencia experimental apunta a que puede asociar, retener, amplificar y consolidar dicha información episódica (Holscher, 2003).



**Figura 6.** Muestra los mecanismos moleculares por los cuales se produce y se mantiene la LTP a largo plazo, la cascada de segundos mensajeros que inducen distintos cambios estructurales, entre los cuales se encuentra el crecimiento de nuevos contactos sinápticos. Se observa la liberación del neurotransmisor, la activación de los receptores AMPA y NMDA, la entrada masiva de calcio, la activación de proteínas cinasas, la transcripción de genes y la traducción de diversos factores de regulación del crecimiento nervioso que pueden llevar, entre otras cosas, al engrosamiento o desarrollo de nuevos botones sinápticos. El conjunto de estas reacciones moleculares en cadena, son las responsables de que la LTP modifique el peso de las sinapsis y en consecuencia determine la facilitación de la conducción de la información por rutas específicas de la red neural Modificado del Kandel et al. 2001.

Una de las evidencias más importantes del papel del hipocampo en el procesamiento de la información espacial, fue el hallazgo de O'Keefe y Dostrovsky en 1971, en que demostraron que existen neuronas en el hipocampo que se activan específicamente cuando el animal está en una localización determinada en el espacio; a estas células se les llamó células de lugar (Fig. 7), las cuales se consideran como aquellas que presentan un incremento en su tasa de disparo en respuesta a un lugar específico en el espacio. Las células que presentan características de disparo de células de lugar, son todas las células piramidales de las regiones del CA1, CA3 y las granulares del GD (en el subículo, también se han encontrado células que responden ante estimulación espacial, principalmente a cambios en la dirección de la cabeza; y en la corteza entorrinal células con múltiples campos receptivos espaciales, denominadas células "grid"). Las células de lugar, presentan un patrón de encendido que parece ser producto de la interacción del organismo con su medio, es decir, es información significativa para el organismo en su interacción con el espacio en el que se encuentre en dicho momento. Los estudios sugieren que las células que presentan campos receptivos espaciales ("place fields"), al responder en conjunto representan todas ellas el contexto espacial, o bien se puede decir que generan un mapa, como lo habría sugerido Tolman (1948) y como lo interpretó O'Keefe y Nadel (1971).



**Figura 7.** 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 la tasa de disparo conforme 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.

Se ha propuesto que el giro dentado funciona como un separador de patrones de actividad provenientes de la corteza entorrinal (McNaughton y Morris 1987) y que sus eferentes, las fibras musgosas, son los detonantes de la actividad neuronal para las células piramidales de CA3. Otros

sugieren también que el GD lleva a cabo esta tarea sobre todo durante el almacenamiento de la información, que es cuando la interferencia con información previa tiene que ser resuelta (Treves y Rolls, 1992; Treves, 2008). Dada las características de escasez de la respuesta en el GD y que la adición de nuevas neuronas puede contribuir a que las poblaciones neuronales que presenten un sesgo en cuanto a su probabilidad de ser reclutadas (Ramírez-Amaya et al., 2006), se ha propuesto que las nuevas neuronas pueden servir como separadores de patrones de actividad neuronal ocurrida en episodios temporales distintos (Aimone et al., 2006) en el orden de semanas.

## **2.2 Genes de expresión inmediata temprana**

Los genes de expresión inmediata temprana (GEITs) son aquellos cuya expresión se induce con actividad neuronal e independientemente de la síntesis de proteínas. Se les considera “*inmediatos*” porque su transcripción es independiente de la síntesis de nuevas proteínas, es decir, aquellos genes cuya expresión se induce aun en presencia de inhibidores de la síntesis de proteínas como anisomicina se consideran genes de expresión inmediata (Worley et al., 1990).

### **2.2.1 Proteína asociada al citoesqueleto regulada por actividad (*Arc/Arg3.1*)**

*Arc* es un gen de expresión inmediata temprana, perteneciente a la familia de los genes efectores; se considera como gen efector a aquel gen cuyo producto proteico tiene un efecto directo en el metabolismo en la función celular. Se ha demostrado que la inducción de la transcripción del ARNm y la traducción de la proteína *Arc* después de una exploración de campo abierto forzada ocurre específicamente en neuronas que participan en procesos de codificación espacial (Guzowski et al., 1999).

*Arc* es un gen con características muy peculiares. Una de ellas, es que se expresa a consecuencia de actividad sináptica (Lyford et al., 1995) y su ARNm se transloca rápidamente al citoplasma (30 minutos después de su expresión inicial). A consecuencia de estimulación máxima, como choques electroconvulsivos, se puede observar la expresión de *Arc* en prácticamente todas las

regiones cerebrales, lo que sugiere que en principio se puede realizar un mapeo de la actividad neuronal de todo el encéfalo con el uso de este método.

Una característica muy singular es que el ARNm de *Arc* viaja a las regiones activas de las dendritas, en donde además de acumularse puede ser traducido localmente (Steward y Worley, 2001) por medio de sistemas poliribosomales localizados en regiones distantes de las dendritas y cercanos a regiones postsinápticas como en las espinas dendríticas.

La forma en la que participa *Arc* como un factor relevante para los cambios plásticos se está elucidando actualmente, algunos de los estudios se han hecho con relación a la secuencia que presenta *Arc*, en los que se ha demostrado que tiene una alta homología con  $\alpha$ -espectrina y co-precipita con F-actina (Lyford et al., 1995). Estas moléculas son importantes proteínas del citoesqueleto, lo que sugiere que *Arc* podría estar relacionado con la plasticidad estructural, particularmente modificando la estructura de las espinas dendríticas, que es donde se localiza (Moga et al., 2004). En congruencia con esta hipótesis, se ha demostrado en cultivos *in vitro* de células del neuroblastoma sin diferenciar *Arc* induce el crecimiento de neuritas cuando interactúa con la subunidad  $\alpha$ -CaMKII (Donai et al., 2003).

Recientemente, se ha demostrado una importante interacción de *Arc* con endofilina y dinamina, en las dendritas; esta interacción induce la endocitosis de receptores AMPA en las dendritas (Chowdhury et al., 2005). Esta función de *Arc* que regula a los receptores AMPA, es un mecanismo importante que permite el escalamiento sináptico (Shepherd et al., 2005), mediante el control exclusivo de las corrientes dependientes de AMPA (Rial et al., 2006), que permite el mantenimiento de la LTP a largo plazo a través de una regulación homeostática de la respuesta post-sináptica de toda la dendrita.

Todos estos datos, sugieren que *Arc* cumple un papel importante en formas persistentes de plasticidad en las dendritas y sus sinapsis, por lo que este gen de expresión inmediata es considerado como importante para la formación de la memoria. La estructura cerebral en donde se ha estudiado en más detalle la expresión de *Arc* es el hipocampo, el cual es una de las estructuras más importantes para la formación de la memoria.

Sin embargo, se ha observado que después de la exploración, las mismas células que expresan el ARNm de *Arc*, lo traducen a proteína con alta eficiencia de traducción (Ramírez-Amaya, et al., 2005). En el giro dentado, la proporción de células que responde a la exploración expresando *Arc* es muy escasa, alrededor del 2% de las células (Ramírez-Amaya et al., 2005; Rosi et al., 2005; Chawla et al., 2005), coincidiendo con datos electrofisiológicos que también muestran una respuesta notablemente escasa y en una proporción muy semejante (Leutgeb et al., 2007). Lo anterior demuestra que la detección de la proteína de *Arc* al igual que su mRNA permite identificar a las unidades celulares que responden a la conducta exploratoria con actividad característica de células de lugar (Ramírez-Amaya et al., 2005).

Sin embargo, con el fin de desarrollar estudios en la integración de nuevas neuronas granulares en el giro dentado se han utilizado genes de expresión inmediata (Ramírez-Amaya et al., 2006) que están relacionados con los eventos bioquímicos, moleculares y estructurales en la adquisición del aprendizaje y la memoria.

### **3. Neurogénesis en el hipocampo**

Desde hace más de 40 años Joseph Altman (1965) demostró la incorporación de timidina tritiada en las células del giro dentado del hipocampo en ratas adultas. Posteriormente Kaplan (1977) combinó autoradiografía y microscopía electrónica confirmando que la incorporación de tritio se da en células con características ultraestructurales de neuronas. Con esto se rompió uno de los dogmas más grandes de las neurociencias:

*“Las células nerviosas – a diferencia de todas las demás células de nuestro cuerpo – no se dividen, no se mueren, no re-nacen”* (Ramón y Cajal en 1914, tomado de la revisión de 1983).

Los métodos inmunohistoquímicos evolucionaron y permitieron combinar la caracterización de los tipos celulares con la identificación de las células que se han dividido, usando un análogo de timidina capaz de ser identificado inmunohistoquímicamente (del Rio y Soriano, 1989). Este

análogo se conoce como 5-bromo-2-deoxiuridina (*BrdU*), el cual, al igual que la timidina, se incorpora a las células durante la fase S de síntesis de ADN, lo cual permite identificar a las células que han pasado por un proceso de división celular durante el tiempo de disponibilidad del *BrdU*. El uso de *BrdU* y su detección con inmunohistoquímica fluorescente permitió combinar la detección de células nuevas con un marcador específico de neuronas como el *NeuN* (Mullen et al., 1992). Con esta tecnología se pudo finalmente demostrar contundentemente el carácter neuronal de las células en división en el cerebro adulto de mamíferos (Corotto, 1993).

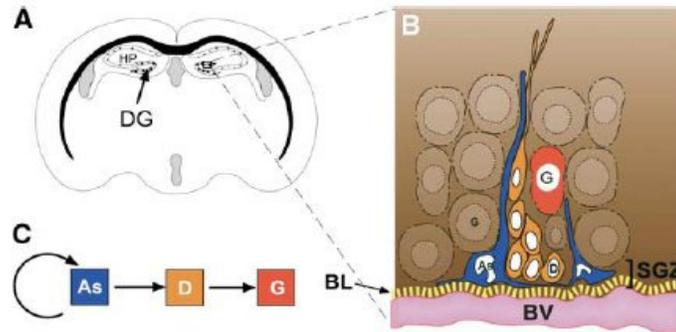
Hoy en día sabemos que las células que proliferan en el cerebro adulto de mamíferos dan lugar a nuevas neuronas que podemos localizar principalmente en dos regiones del sistema nervioso, el bulbo olfatorio y giro dentado en el hipocampo. Sin embargo, uno de los lugares en donde se describió por primera vez la generación de nuevas neuronas en el cerebro adulto, fue en el giro dentado del hipocampo, y es aquí, donde se han llevado a cabo la mayor parte de los estudios de neurogénesis encaminados a resolver la pregunta de la relevancia funcional de las nuevas neuronas.

### **3.1 Proliferación e integración anatómica de las nuevas neuronas**

Hay dos tipos de progenitores neurales que pueden ser reconocidos en la zona subgranular (SGZ) de acuerdo a su morfología y la expresión de marcadores específicos. Los progenitores hipocampales **Tipo I** (astrocitos radiales) proyectan procesos radiales que sirven como guía para que las células granulares viajen a través de la capa granular del giro dentado (Alvarez-Buylla et al., 1993), hasta establecerse en un lugar y a partir de él extender sus dendritas hacia la capa molecular y los axones hacia las dendritas de las células piramidales de CA3 (Fig. 8).

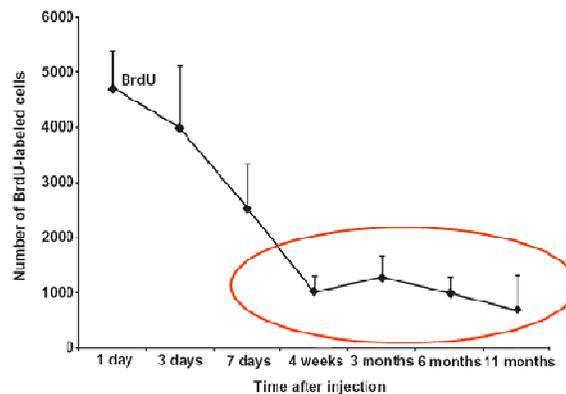
Los astrocitos radiales tienen la capacidad de transformar su destino de diferenciación para dar origen a los progenitores **Tipo II**, conocidos como células D (células multipotenciales), las cuales pueden dar origen posteriormente a neuronas granulares o a células gliales (Zhao et al., 2008) (Fig. 8).

Estudios cuantitativos revelan que en el hipocampo del cerebro adulto de rata nacen 9000 células por día aproximadamente, contribuyendo con un 3.3% de las células granulares por mes o 0.1% por día (Cameron y McKay, 2001).



**Figura 8.** Neurogénesis en la zona subgranular. (A) Corte coronal de cerebro de ratón, con el fin de visualizar el hipocampo (HP). El giro dentado (DG) se muestra marcado en negro. La SGZ del DG se muestra ampliada en (B). (B) Arquitectura de la SGZ. Astrocitos (As, azul oscuro) Células nuevas migratorias sin diferenciarse (Células D, naranja), células granulares (Células G, rojo). (C) Linaje de las nuevas células en la capa subgranular. Tomado de Alvarez-Buylla, *et al.*, 1993.

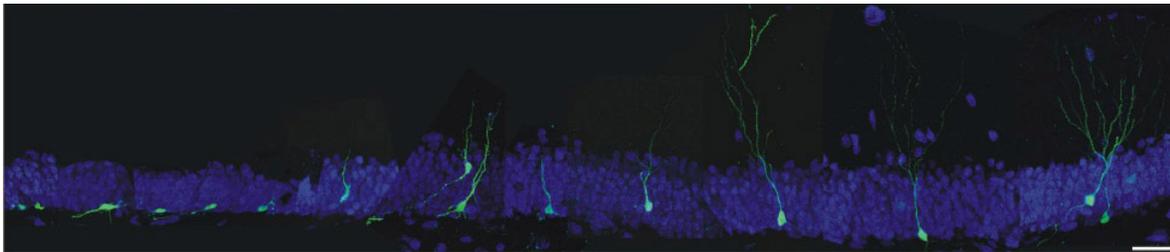
Sin embargo, durante el periodo crítico que se evidencia hasta el día 30-45 después de la proliferación de estas nuevas células granulares, el 80% de estas mueren, esto se determinó al observar una notable disminución en el número de células marcadas con *BrdU* a lo largo del tiempo después de la división (Fig. 9), y gracias a que se ha demostrado que la intensidad del marcaje con *BrdU* no disminuye en las células marcadas con el transcurso del tiempo. De esta manera se sabe que aproximadamente el 20% de las nuevas células granulares que nacen en el adulto sobreviven y terminan exitosamente el proceso de maduración y diferenciación hasta por 11 meses (Kempperman *et al.*, 2003).



**Figura 9.** Curva de sobrevivencia de las nuevas células granulares. Se observa el decremento en el número de células producidas en la SGZ observado en un experimento donde los animales fueron sacrificados en periodos temporales independientes entre 1 día y 11 meses. Tomado de Kempermann *et al.*, 2003.

Con el uso de trazadores retrógrados se ha observado que las nuevas neuronas granulares que sobreviven extienden sus axones en la trayectoria esperada (Stanfield y Trice, 1988) alcanzando las dendritas de las células piramidales en la región de CA3 (Hastings y Gould, 1999) (Fig. 10).

También sabemos que las nuevas neuronas desarrollan sus proyecciones dendríticas hasta atravesar la capa de células granulares y alcanzar la zona molecular, a donde arriban las fibras provenientes de la corteza entorhinal (Esposito et al., 2005; Ge et al., 2006) y sus axones son extendidos hacia las células piramidales de CA3 (Blackstad et al., 1970). El árbol dendrítico y la estructura axonal inicia su desarrollo una vez hayan transcurrido 14 días a partir del nacimiento de estas neuronas (Esposito et al., 2005) (Fig. 10).



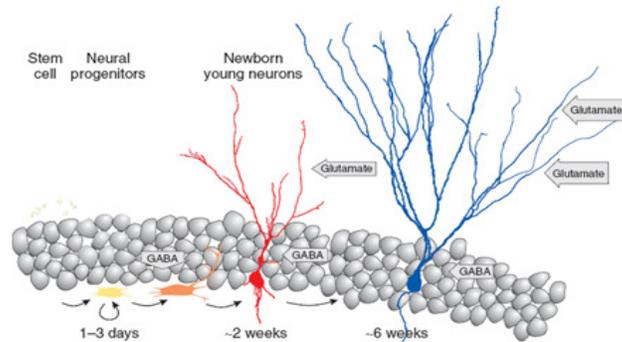
**Figura 10.** Migración de las nuevas neuronas a través de la capa granular del giro dentado. Se observa la migración de células de 1-28 días, estas células fueron marcadas con BrdU, una vez transcurrido el día 14 se observa el desarrollo dendrítico de estas células que van madurando anatómicamente. Tomado de Esposito et al., 2005.

### 3.2 Integración funcional de las nuevas neuronas a la red hipocampal

Se ha observado que, para que exista la integración total de las nuevas neuronas se requiere el establecimiento tanto de aferencias como eferencias dentro del circuito trisináptico neuronal anteriormente descrito.

Estudios electrofisiológicos han demostrado que en el proceso de integración, las nuevas células granulares producidas en el hipocampo muestran una activación tónica inicial debido al ambiente GABAérgico y a las aferentes sinápticas que responden a este neurotransmisor de forma depolarizante, posteriormente se observa entradas glutamatérgicas y finalmente los *inputs* GABAérgicos perisomáticos (Esposito et al., 2005).

Después de una fase de maduración prolongada, las nuevas neuronas exhiben propiedades eléctricas y sinápticas que son indistinguibles de las células granulares maduras preexistentes, las cuales fueron registradas electrofisiológicamente (Laplagne et al., 2006).



**Figura 11.** Desarrollo de las nuevas células granulares generadas en el hipocampo adulto. El neurotransmisor GABA se muestra despolarizante al inicio de la maduración, sin embargo, en etapas más avanzadas se observa hiperpolarizante en las nuevas neuronas. Tomado de Bischofberger et al., 2007.

El GABA (ácido- $\gamma$ -amino butírico) y el glutamato son los mejores neurotransmisores inhibitorios y excitatorios respectivamente (Fig. 11), para las neuronas maduras en el cerebro adulto. Estos neurotransmisores activan neuronas no solo en hendiduras sinápticas (activación fásica), sino que también difunden a diferentes distancias fuera de la sinapsis (activación tónica) (Farrant y Nusser, 2005).

También se ha demostrado que las neuronas sobrevivientes desarrollan propiedades electrofisiológicas de neuronas y presentan respuestas ante la estimulación que indica que sus sinápsis son funcionales (van Praag, et al., 2002). El desarrollo de las características electrofisiológicas de las nuevas células granulares y su capacidad de responder a la estimulación entrante, coincide con lo que se ha observado anatómicamente. Las nuevas neuronas en el giro dentado pasan por un periodo inicial en donde la célula no es capaz de responder a la estimulación entrante y su potencial de reposo es de ( $\sim -41$  mV), notablemente diferente al de una célula madura ( $\sim -70$ mV).

Los progenitores neurales en el hipocampo adulto y las neuronas inmaduras expresan receptores GABA ionotrópicos funcionales. Las nuevas células granulares muestran un decremento gradual

en la expresión de un transportador de  $\text{Cl}^-$ : NKCC1 (el cual importa  $\text{Cl}^-$  cuando la concentración intracelular de este ión es baja), con un incremento en la expresión de un transportador de  $\text{Cl}^-$ : KCC2 (el cual exporta  $\text{Cl}^-$  cuando la concentración intracelular de este ión es alta), durante su proceso de maduración (Ge et al., 2006). Como consecuencia, el GABA despolariza inicialmente las nuevas neuronas inmaduras a causa de su alto contenido de  $\text{Cl}^-$ , esta despolarización es convertida gradualmente a hiperpolarización luego de un periodo de 2-3 semanas.

Análisis electrofisiológicos muestran la expresión de receptores ionotrópicos de glutamato en las neuronas inmaduras. Estudios inmunohistoquímicos sugieren que las subunidades del receptor a glutamato NR1 y NR2B son expresados en etapas tempranas durante la neurogénesis del adulto (Nacher et al., 2007). Estos resultados sugieren un periodo crítico para las nuevas neuronas, cuya sobrevivencia depende de la competencia por receptores NMDA. Interesantemente, este periodo crítico coincide con el periodo de transición de señalización de GABA excitatorio a GABA inhibitorio. Las nuevas células granulares de 4-6 semanas después de su nacimiento, exhiben una reducción en la inducción de umbrales e incrementan la amplitud de la LTP en respuesta a patrones fisiológicos de estimulación (Ge et al., 2007). Este periodo crítico está asociado con la contribución sináptica regulada de NR2B contenido en los NMDARs (receptores NMDA) en las nuevas neuronas adultas, si estos receptores que contienen esta unidad son inhibidos farmacológicamente, el LTP es abolido completamente.

Las nuevas células granulares producidas en el hipocampo adulto muestran un número único de propiedades durante su proceso de maduración e integración que las distinguen de las neuronas maduras pre-existentes, incluyendo (i) despolarización por GABA, ocurre en células con menos de 3 semanas de nacimiento, (ii) aumento en la excitabilidad y baja inducción del umbral en el LTP (2-4 semanas después del nacimiento), (iii) gran amplitud del LTP (entre 4-6 semanas de desarrollo), (iv) formación retrasada de inervaciones gabaérgicas perisomáticas (por encima de las 4 semanas de desarrollo) (Esposito et al., 2005); estas propiedades aparecen probablemente en eferentes sinápticos de las nuevas neuronas. Además, se observan dos periodos críticos en este tipo de células, las cuales son sometidas a una integración selectiva dependiente de actividad dentro de los circuitos neuronales, incluyendo (i) sobrevivencia competitiva dependiente de

NMDARs entre la población de las nuevas neuronas (2-3 semanas), (ii) aumento de la plasticidad sináptica dependiente de NR2B de las nuevas neuronas (4-6 semanas) (Ge et al., 2008).

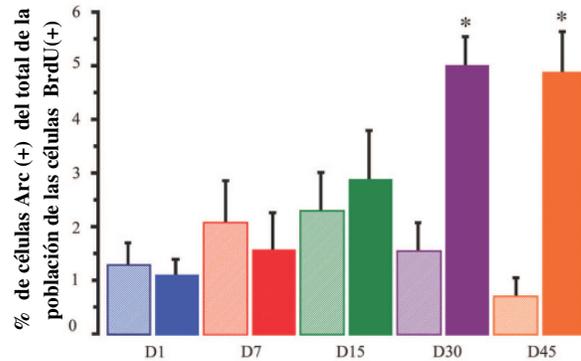
#### **4. Procesamiento de información en las nuevas células granulares del hipocampo**

En algunos trabajos desarrollados con el uso de un agente de metilación del DNA conocido como metilazoxymetanol acetato (MAM), se ha observado que la inhibición de la proliferación de precursores neuronales en el hipocampo altera el aprendizaje de un condicionamiento de parpadeo adquirido con un procedimiento de huella (Shors et al., 2001), pero en un trabajo posterior este mismo grupo encontró que el tratamiento con MAM disminuye la fuerza de la respuesta condicionada en una tarea de miedo condicionado adquirido con un procedimiento de huella, pero no afectó otros aprendizajes que también son dependientes del hipocampo, como el condicionamiento de miedo al contexto y una tarea de laberinto de agua de Morris (Shors et al., 2002). Otros sin embargo, han encontrado que la reducción del número de nuevas neuronas, con otro método como la irradiación, si altera una tarea espacial como el laberinto de agua de Morris.

Si bien estos hallazgos sugieren la necesidad de proliferación para la correcta ejecución de ciertas tareas dependientes del hipocampo, no dejan claro cuál es el papel de las nuevas neuronas en el procesamiento de la información episódica. Por esta razón, se cuenta con nuevas estrategias metodológicas para abordar el problema del papel de las nuevas neuronas en el procesamiento de información episódica. Este método de imagenología consiste en detectar anatómicamente y funcionalmente células que a consecuencia de la estimulación conductual expresan GEIs. Con el uso de inmunohistoquímica para identificar el gen efector de expresión inmediata *Arc* y la obtención de imágenes con microscopía confocal se ha logrado identificar las nuevas neuronas que responden a una conducta.

Ramírez et al., (2006) observaron que las nuevas células granulares responden a la conducta de exploración después de 5 meses de maduración, lo cual sugiere que se integran a la red neuronal de forma eficiente, además de que estas nuevas neuronas son más sensibles a la conducta, semejante a lo que han observado otros grupos en neuronas más jóvenes (Kee et al., 2007; Tashiro et al., 2007).

Sandoval y cols (2011) observamos que la expresión de Arc asociada específicamente a la conducta ocurre hasta el día 30 y con más claridad en el día 45 (Fig. 12). Esto sugiere que durante el proceso de maduración de las nuevas neuronas, éstas se integran funcionalmente a la red de manera efectiva contribuyendo al procesamiento de información en el hipocampo. Sin embargo, el periodo de integración funcional de las nuevas células puede ser disminuido a 15 días con ejercicio voluntario en ruedas de actividad (Bello et al., en preparación).



**Figura 12.** Porcentaje de células Arc positivas del total de la población de células BrdU-NeuN positivas en exploración de campo abierto forzada. Animales expuestos a la caja de exploración un día (D1), 7 días (D7), 15 días (D15), 30 días (D30), 45 días (D45) después de la inyección de BrdU. Las barras oscuras representan a los animales experimentales y las barras claras los controles. \* p<0.01 con respecto a su control. Tomado de Sandoval et al., 2011.

El mapeo de la actividad de neuronas nuevas se ha convertido ahora en una herramienta útil para estudiar el papel de la neurogénesis en el procesamiento de información. Tashiro y colaboradores (2007) utilizaron esta herramienta para evaluar si las neuronas que sobreviven con la exposición del animal a un ambiente enriquecido, eran o no capaces de responder posteriormente a este, y encontraron que si son capaces de hacerlo, que algunas de las nuevas neuronas reclutadas particularmente alrededor de la segunda semana, eran capaces de responder al ambiente enriquecido pero no a una tarea de laberinto de agua. Más recientemente, Trouche y cols (2009) observaron que una tarea de laberinto de agua podía hacer que las neuronas jóvenes (de 9 días de edad) tendieran a responder con mayor probabilidad durante un procedimiento de re-entrenamiento (ocurrido en el día 40) cuando las nuevas neuronas ya han madurado, sugiriendo que la actividad neuronal durante los periodos de inmadurez puede marcar a las células que responderán en la memoria a largo plazo. Estos trabajos son solo algunos de los ejemplos de lo que esta tecnología permite explorar, lo que nos permite entender que estamos listos para

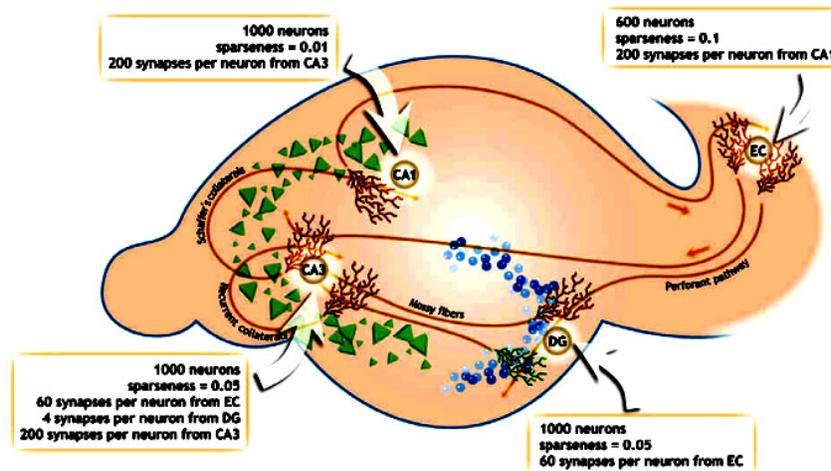
confrontar preguntas relacionadas al procesamiento de información en el hipocampo y particularmente el papel del giro dentado.

#### 4.1 Modelo computacional de Weisz y Argibay

Existen una serie de trabajos con múltiples técnicas que tratan de elucidar la función de las nuevas células granulares en el hipocampo, sin embargo, los modelos matemáticos logran postular hipótesis experimentales y verificables con el objetivo de esclarecer las funciones biológicas.

En este orden, el hipocampo es susceptible a este tipo de modelos, es decir, tiende a ser relativamente preservado a lo largo de la escala filogenética y la arquitectura de la red es relativamente fácil de ser simulada en un enfoque neurocomputacional (Weisz y Argibay, 2009).

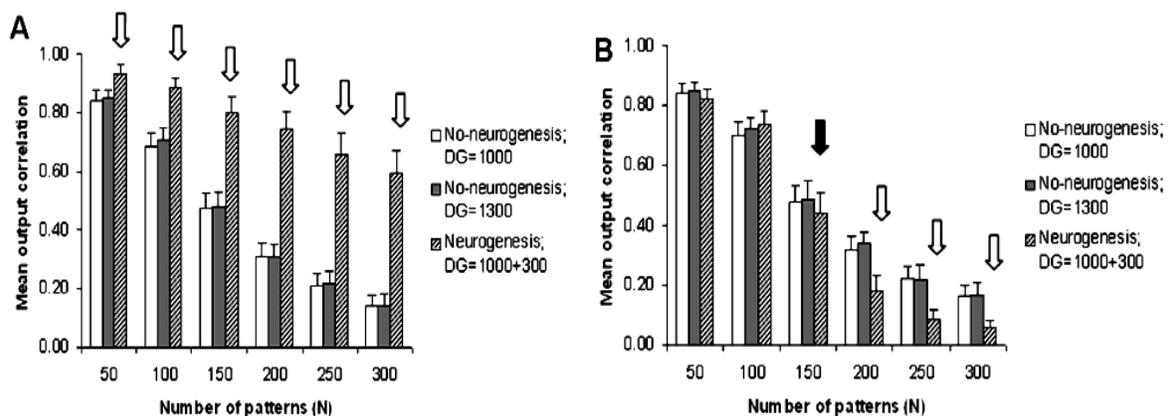
Este modelo se basó principalmente en las características del modelo computacional del hipocampo propuesto por Treves y Rolls en 1994, (Fig. 13) en este modelo introducen procesos que no se habían tenido en cuenta como la generación de nuevas neuronas, en donde la simulación de la neurogénesis ocurre en un evento fisiológico y de esta manera se infiere los efectos de la generación de nuevas neuronas en la función hipocampal en relación a memorias episódicas.



**Figura 13.** Modelo computacional de la conectividad del hipocampo. La corteza entorrinal (EC), el giro dentado (DG), subregiones cuernos de Amón (CA1, CA3). Se muestra el circuito trisináptico del hipocampo y en recuadros se resaltan las características que se tuvieron en cuenta para cada región del hipocampo. El número de células, la conectividad y la escasez de cada región son mostradas en esta figura. En azul oscuro se muestran las nuevas células granulares (aquellas que nacen en la etapa adulta). Tomado de Weisz y Argibay, 2009.

Teniendo en cuenta cada una de las características fisiológicas, se compararon tres grupos experimentales en la evocación de una memoria episódica remota y una memoria reciente (Fig. 14), uno de estos sistemas consiste en un sistema en el cual el giro dentado contiene 1000 neuronas aproximadamente en el cual no hay la generación de nuevas neuronas, en otro sistema el giro dentado tiene 1300 neuronas en donde 300 de ellas son añadidas con respecto al primer grupo pero no son nuevas neuronas y en el tercer sistema el giro dentado contiene 1300 neuronas de las cuales 300 son nuevas neuronas con características tan importantes como su bajo umbral para la inducción del LTP (Schmidt-Hieber et al., 2004), cuya característica las hace más plásticas (Ramírez-Amaya et al, 2006).

Los datos indicaron que la evocación de la memoria reciente es más eficiente en aquel sistema en el cual el giro dentado contiene 1300 neuronas de las cuales 300 son nuevas neuronas; evidentemente, esta eficiencia se ve incrementada a medida que aumentan los patrones de discriminación (Fig. 14A), es decir, el número de objetos utilizados en la tarea conductual; en los otros dos sistemas considerados la eficiencia en la evocación de memorias recientes decrementa conforme aumenta el número de patrones a discriminar.



**Figura 14.** Modelo computacional en condiciones fisiológicas en el procesamiento de información episódica con 3 grupos de sistemas. A. Memoria reciente. B. Memoria remota. Las flechas blancas indican  $p < 0.01$  y la flecha negra indica  $p < 0.05$  obtenidas con una ANOVA,  $n=20$  ensayos conductuales. Tomado de Weisz y Argibay, 2010.

Sin embargo, durante la evocación de la memoria remota, se observó que las nuevas neuronas no tienen un importante papel en el procesamiento de información episódica, a medida que

aumentaron los patrones a discriminar también decremento la eficiencia en la evocación de la memoria (Fig. 14B).

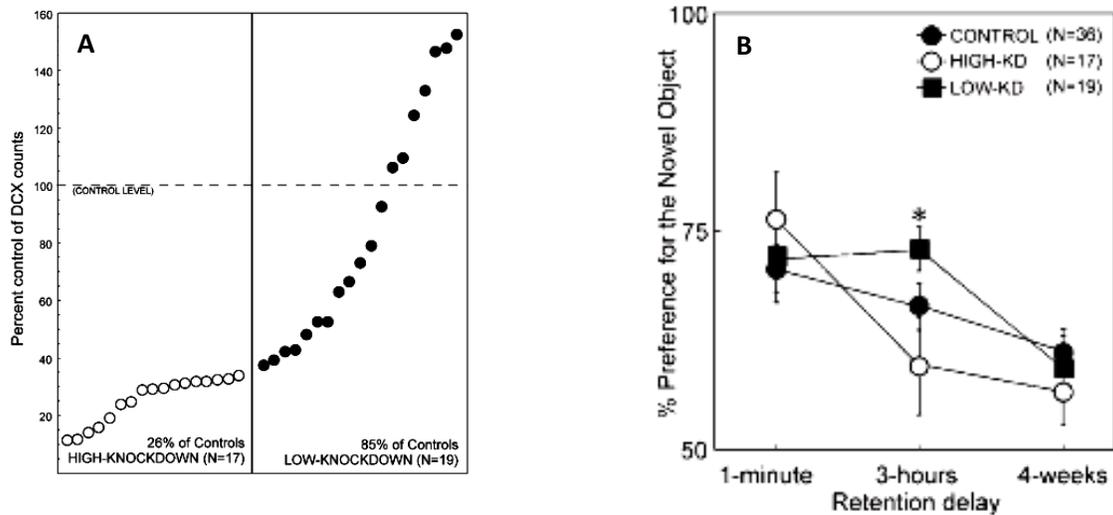
Con este modelo computacional se concluye que la neurogénesis tiene un importante papel en el incremento de la capacidad de la red hipocampal para el procesamiento de la información nueva, esto se le atribuye a las características predominantes de las nuevas neuronas, dando así al organismo una dinámica de adaptación al ambiente.

#### **4.2 Inhibición de la proliferación de las células precursoras en el hipocampo**

En búsqueda de elucidar la funcionalidad de las nuevas células granulares generadas en el hipocampo en la edad adulta se han utilizado algunas técnicas para la inhibición de la neurogénesis en la rata y en el ratón adulto entre las cuales se encuentran la inhibición con irradiación, administración de MAM en la SGZ, ablación genética de las células precursoras en la SGZ, bloqueo del ciclo celular de los progenitores neuronales e inhibición de la vía de señalización *Wnt*. Jessberger y cols, (2009) inhiben la generación de las células progenitoras de las nuevas neuronas en ratas adultas con la administración de un lentivirus que expresa *Wnt* dominante negativo (dnWNT) que inhiben la vía de señalización *Wnt*, la cual juega un papel muy importante en la generación de nuevas neuronas en el giro dentado del animal adulto.

Sin embargo, el método no logró inhibir por completo la generación de las nuevas células granulares, se encontró una alta variabilidad en el grado de inhibición de las células precursoras hipocampales obteniendo una alta inhibición en aquellos animales donde se encontró menos del 35% de células doblecortina (DCX) positivas con respecto a los animales control (26% células nuevas en promedio con respecto al control) y una baja inhibición en aquellos animales en los cuales se encontró un porcentaje de células positivas a DCX superior al 35% (promedio de 85% células nuevas en promedio con respecto al control) (Fig. 15A).

Posteriormente se observó el impacto de la inhibición en las generación de las nuevas neuronas en procesamiento de información durante la evocación de una memoria reciente (1 minuto, 3 horas) y una memoria remota (4 semanas) en la tarea de reconocimiento de objetos.



**Figura 15. A.** Inhibición de la neurogénesis en la rata adulta. Cada círculo representa el conteo de células doblecortina (DCX) positivas de cada animal expresado como porcentaje de la media del conteo de células DCX positivas del grupo control. **B.** porcentaje de preferencia del objeto novedoso durante la prueba de evocación de la tarea de reconocimiento de objetos. \*  $p < 0.05$ . Tomado de Jessberger et al., 2009.

Sin embargo, se obtuvieron resultados confusos pues la alta inhibición de la neurogénesis afecta la evocación de la memoria reciente de 3 horas, este efecto se observa hasta las 4 semanas, no obstante este efecto no es significativo con respecto a los grupos controles; por el contrario en los animales donde hubo una baja inhibición de la neurogénesis se vio incrementada la evocación de las memorias recientes (3 horas) (Fig. 15B).

Debido a la cantidad de irregularidades con algunas técnicas como son la inhibición de la neurogénesis hipocampal con drogas (MAM), irradiación (rayos X) y la inhibición de la vía *Wnt*, las cuales poseen poca precisión como lo demuestra este tipo de trabajos es útil utilizar la detección de genes de expresión inmediata temprana como *Arc* en la integración de las nuevas neuronas granulares en las redes hipocampales durante el procesamiento de información.

### 5. Tarea de reconocimiento de objetos

La memoria de reconocimiento de objetos es considerada como una prueba común de memoria declarativa, en la cual podemos definir a la memoria declarativa como la memoria de hechos y eventos, que normalmente se divide en memoria episódica (memoria de eventos) y memoria semántica (memoria para la información general) (Squire y Zola-Morgan, 1988). A su vez

involucra en el procesamiento de información a una variedad de procesos cognoscitivos necesarios para la integración de información multimodal.

La tarea de reconocimiento de objetos es un paradigma conductual para roedores en donde se evalúa la memoria declarativa y con la cual se ha contribuido en gran medida a la comprensión de las bases neurobiológicas de la memoria (Ennaceur y Delacour, 1988). En este paradigma conductual se observa la tendencia natural de las ratas para explorar estímulos nuevos con respecto a estímulos familiares. La ventaja de la tarea de reconocimiento de objetos es que no se requiere un pre-entrenamiento y no involucra ningún programa de reforzamiento.

Este paradigma conductual generalmente solo requiere una sesión de adquisición y una de prueba de retención, sin embargo, la información adquirida en una sesión de entrenamiento solo puede ser evocada hasta un periodo máximo de 48 horas con un buen nivel de ejecución o hasta 72 horas con un menor nivel de retención (Balderas et al., 2008).

Se considera que la tarea de reconocimiento de objetos es dependiente de estructuras del lóbulo temporal medial, en las cuales se incluye el hipocampo, la corteza entorrinal, la corteza perirrinal y la corteza parahipocampal (Squire y Zola-Morgan, 1991).

Se consideran dos formas de la tarea de reconocimiento de objetos, una de ellas es la tarea de reconocimiento de objeto novedoso y la otra es la tarea de reconocimiento de objetos dependiente de lugar (Mumby, 2001).

### **5.1 Tarea de reconocimiento de objeto novedoso**

En general la tarea de reconocimiento de objeto novedoso consiste en dos fases, en la primera fase el animal es colocado en un ambiente con dos objetos a familiarizar, los cuales se conocen como “*objetos muestra*”, después de esta exposición el animal es colocado en su caja habitación por un periodo de retención. En la segunda fase, el animal es colocado nuevamente en el ambiente que contiene dos objetos, siendo uno de ellos el objeto muestra y el otro es un “*objeto novedoso*”. El animal explora en mayor proporción el objeto novedoso (Ennaceur y Delacour, 1988).

Se cree que en esta variable del paradigma conductual de reconocimiento de objetos es más dependiente de corteza perirrinal (Oliveira et al., 2010).

## **5.2 Tarea de reconocimiento de objetos dependiente de lugar**

En esta segunda forma de ejecutar la tarea de reconocimiento de objetos el procedimiento es muy similar a la tarea de reconocimiento de objeto novedoso; también se divide en dos fases, en la primera el animal es expuesto al ambiente en donde se le colocan los dos “objetos muestra” a familiarizar. En la segunda fase el animal es nuevamente colocado en el mismo ambiente con los mismos objetos muestra, sin embargo, la ubicación de uno de ellos cambia con respecto al espacio. El sujeto experimental tiende a explorar en mayor proporción a aquel objeto que fue cambiado de posición (Oliveira et al., 2010).

Se ha sugerido que esta forma de la tarea de reconocimiento de objetos es más dependiente de hipocampo (Stupien et al., 2003) debido al cambio de posición del objeto en el contexto, la novedad en el roedor es causada por la nueva ubicación del objeto con respecto a la configuración espacial que había construido el animal con anterioridad en la primer fase de la tarea.

## **5.3 Papel del hipocampo en la tarea de reconocimiento de objetos**

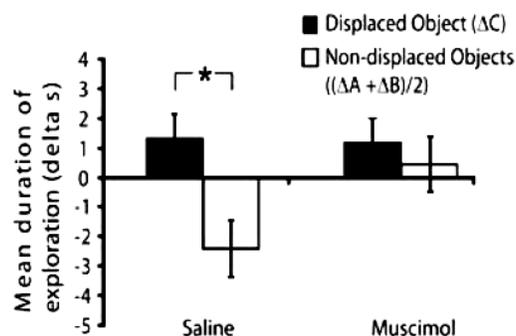
Actualmente existe controversia acerca del papel del hipocampo en el procesamiento de información de la tarea de reconocimiento de objetos (Winters et al., 2008; Bussey y Angleton, 2002; Oliveira et al., 2010), sin embargo, se han encontrado evidencias de que existe una función de disociación entre la corteza perirrinal y el hipocampo (Winters et al., 2008), cuya disociación se ha observado cuando se afecta el funcionamiento de una de estas estructuras sin afectar el funcionamiento de la otra, por ejemplo, en algunos trabajos se ha lesionado la corteza perirrinal sin afectar el procesamiento de información espacial en el animal cuyos experimentos sugieren que hay una competencia entre las dos estructuras, pues, en el caso en el cual se lesiona una sola región se ve aumentada la función de la otra. Sin embargo, se han observado otros grupos de

experimentos en donde se han realizado lesiones neurotóxicas en estas dos estructuras provocando una alteración negativa en la ejecución de la tarea de reconocimiento de objetos.

También se ha demostrado que bajo condiciones estrictas de distribución en el paradigma conductual, un hipocampo intacto no es esencial para la ejecución de la tarea de reconocimiento de objetos, lo cual sugiere que el hipocampo contribuye en gran medida en este paradigma conductual en cuanto a la ubicación del organismo con respecto al espacio (Forwood et al., 2005).

La corteza perirrinal y postrinal tienen proyecciones en paralelo hacia el hipocampo. Esto valida con alta probabilidad que el hipocampo está involucrado en la integración de la información visoespacial del objeto. Con esto se infiere una asociación entre las tres estructuras que subyacen la formación de memorias episódicas complejas (Bussey y Angleton, 2002).

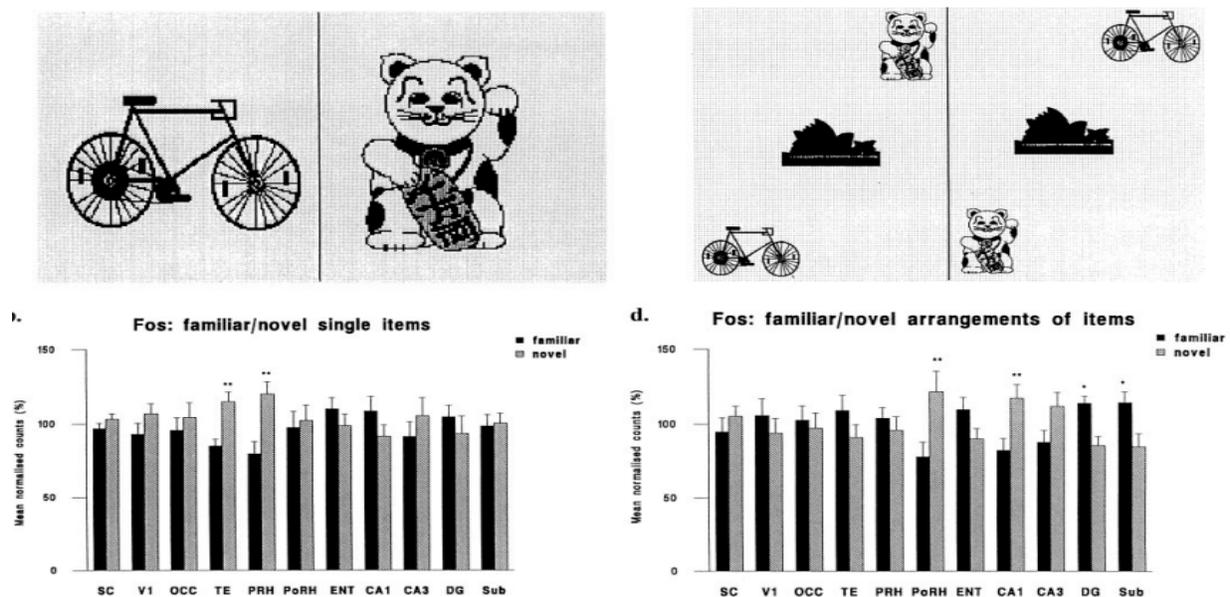
En trabajos un poco más recientes se ha reportado que en la inactivación del hipocampo utilizando muscimol (agonista de receptores GABA A) se afecta el reconocimiento de objetos espacial, pues el animal no es capaz de reconocer cual fue el objeto desplazado observándose en igual tiempo de exploración para todos los objetos (Fig. 16) (Oliveira et al., 2010).



**Figura 16.** Inyecciones intrahipocampales de muscimol administradas inmediatamente después de la sesión de adquisición. ΔC: tiempo exploración objeto C, ΔB: tiempo exploración objeto B, ΔA: tiempo exploración objeto A. n= 10 \*p<0.05. Tomado de Oliveira et al., 2010.

En otros experimentos en donde se ha observado la expresión de GEITs como es el caso de *c-Fos* en la tarea de reconocimiento de objetos la cual fue ejecutada en sus dos variables; en una de

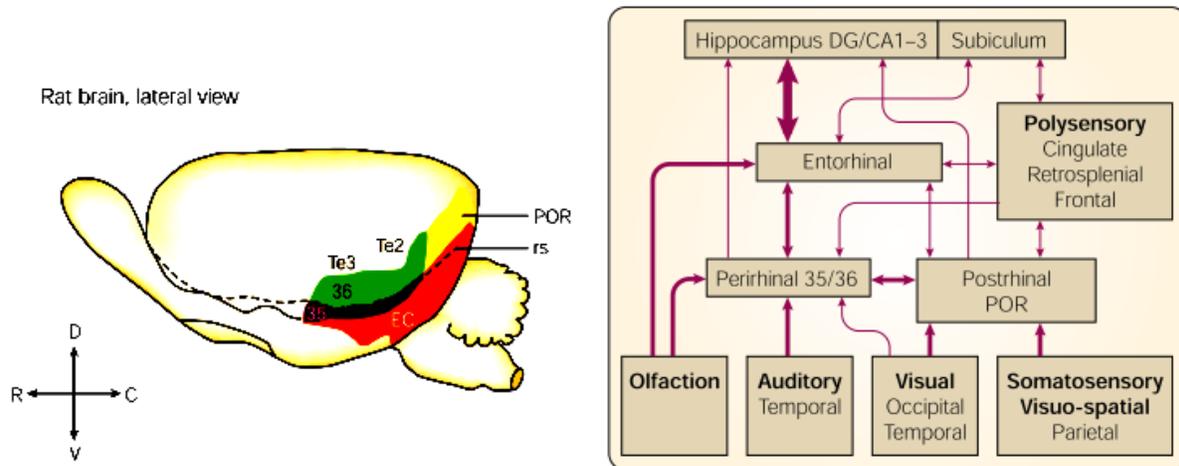
ellas la rata es sometida a dos estímulos visuales iguales, los cuales son familiarizados y el día de prueba se cambia uno de ellos por un estímulo visual novedoso (Fig. 17); en la segunda forma de la tarea conductual, el animal es expuesto a 3 estímulos visuales diferentes y el día de la prueba cambia la configuración de los estímulos con respecto al espacio, pero siguen siendo los mismos que fueron expuestos durante la adquisición. Se observó mediante la activación de *c-Fos* que estructuras como el lóbulo temporal y la corteza perirrinal responden ante la novedad del estímulo de la primer variante de la tarea conductual, pero esto no ocurre en el hipocampo. Sin embargo, en la segunda variante de la tarea en donde los 3 estímulos son familiares y solo varía la posición de ellos ante el contexto, se encontró que subregiones del hipocampo como CA1 y GD expresan *c-Fos*, lo cual sugiere que están implicadas en el procesamiento de este tipo de información (Wan et al., 1999) (Fig. 17).



**Figura 17.** Expresión de *c-Fos* en dos tipos de tarea de reconocimiento de objetos. Superior derecha y superior izquierda, estímulos utilizados en la tarea de reconocimiento de objetos. Inferior derecha e inferior izquierda, conteos normalizados de *c-Fos* en regiones cerebrales en las dos formas de la tarea conductual (objeto novedoso y cambio de configuración con respecto al contexto). SC: colículo superior, V1: corteza visual primaria, OCC: corteza occipital, TE: lóbulo temporal, PRH: corteza perirrinal, PoRH: corteza posrrinal, ENT: corteza entorrinal, CA1: cuerno de Ammon 1, CA3:cuerno de Ammon 3, GD: giro dentado, Sub: subículo. Diferencias entre grupos \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ . Modificado de Wan et al., 1999.

En el trabajo de Brown y Aggleton (2001) se plantea un modelo de flujo de información en el cual muestra que el hipocampo está implicado en el procesamiento de información de reconocimiento de objetos pues la corteza entorrinal le envía información acerca de la novedad y

el hipocampo procesa información de familiaridad y ubicación de estímulos con respecto al contexto (Fig. 18).



**Figura 18.** Conectividad en el procesamiento de información en la tarea de reconocimiento de objetos. Diagrama de conexiones que muestra las rutas paralelas de información sensorial que alcanza la corteza y el hipocampo en el procesamiento de información de reconocimiento de objetos. Corteza perirrinal (novedad), hipocampo (contexto y familiaridad). D: dorsal, C: caudal, V: ventral, R: rostral, POR: corteza posrrinal, rs: sulco rinal, EC: corteza entorrinal, Te2: corteza temporal 2, Te3: corteza temporal 3, 35: área de Broadmann 35, 36: área de Broadmann 36. Modificado de Brown y Aggleton (2001).

## JUSTIFICACIÓN

Durante los últimos años una gran cantidad de investigaciones se han encaminado a dilucidar la función de las neuronas granulares que nacen en la zona subgranular del giro dentado en el hipocampo. Por ejemplo, se han hecho experimentos donde se caracteriza electrofisiológicamente a estas nuevas neuronas granulares y se ha demostrado que sus *inputs* sinápticos son funcionales y pueden sufrir modificaciones sinápticas (van Praag et al., 1999; Schmidt-Hieber et al., 2004); se ha recurrido también a la inhibición de la proliferación de las células precursoras neuronales en la zona subgranular y se ha observado que ésta altera la ejecución de tareas dependientes del hipocampo (Jessberger et al., 2009; Shors et al., 2002); así mismo, se ha observado que estas nuevas neuronas responden ante conductas como lo son la exploración en una caja de campo abierto (Ramírez-Amaya et al., 2006), durante la adquisición y evocación de una tarea de laberinto de agua de Morris (Kee et al., 2007), entre otras.

Por otro lado, se han propuesto modelos computacionales que han tratado de interpretar la funcionalidad de estas nuevas neuronas en los cuales se ha propuesto que las nuevas neuronas responden en mayor proporción en la evocación de memorias recientes (Weisz y Argibay, 2009), lo que coincide con los resultados de un experimento de alta y baja inhibición de la neurogénesis afecta la prueba retención de una tarea de reconocimiento de objetos a corto plazo (Jessberger et al., 2009). Sin embargo, la mayoría de técnicas utilizadas para la inhibición de la neurogénesis en el hipocampo afectan de forma indirecta la conducta del animal, lo cual sugiere que se deben de buscar otras técnicas para el estudio de estas nuevas neuronas y su participación en el procesamiento de información de memorias episódicas.

Este trabajo de investigación busca contribuir con datos obtenidos a partir de una herramienta que utiliza GEITs como es el caso de Arc, el cual es considerado indicador de actividad neuronal que puedan sugerir alguna funcionalidad de estas nuevas neuronas granulares en la ejecución de tarea de reconocimiento de objetos. De esta manera, consideramos muy importante intentar resolver algunas preguntas:

*¿Las nuevas neuronas granulares responden en mayor proporción a la prueba de retención de una memoria reciente o una memoria remota mediante la ejecución de la tarea de reconocimiento de objetos?*

*¿El número de nuevas células granulares que expresan la proteína de Arc se correlaciona con la eficiencia del animal en la ejecución de la tarea de reconocimiento de objetos?*

## **HIPÓTESIS**

1. Ho: No habrá correlación entre el número de nuevas células granulares que expresan la proteína de *Arc* y la eficiencia de los animales en la ejecución de la tarea de reconocimiento de objetos.

H1: Habrá correlación entre el número de nuevas células granulares que expresan la proteína de *Arc* y la eficiencia de los animales en la ejecución de la tarea de reconocimiento de objetos.

2. Ho: No se encontrará un mayor número de nuevas células granulares que expresan *Arc* en la prueba de retención de memoria reciente en la ejecución de una tarea de reconocimiento de objetos.

H1: Se encontrará un mayor número de nuevas células granulares que expresan *Arc* en la prueba de retención de memoria reciente en la ejecución de una tarea de reconocimiento de objetos.

## **OBJETIVO GENERAL**

Observar el número de nuevas células granulares que expresan la proteína de *Arc* en la prueba de retención remota o reciente de la tarea de reconocimiento de objetos y determinar si la cantidad de estas nuevas neuronas granulares *Arc* positivas se correlaciona con la eficiencia de los animales en la ejecución de este paradigma conductual.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Observar el número de nuevas células granulares que traducen la proteína *Arc* ante una prueba de retención de memoria reciente y memoria remota con objeto familiar y con objeto novedoso.
2. Observar si hay alguna correlación entre la eficiencia en la ejecución de la tarea de reconocimiento de objetos y el número de nuevas neuronas granulares que expresan la proteína de *Arc* en una prueba de memoria de reconocimiento de objetos.
3. Evaluar la ubicación de las nuevas células granulares que presentan la proteína *Arc* en las diferentes capas de la capa granular del giro dentado en el hipocampo en los diferentes grupos experimentales (control, exploración de contexto, prueba de retención de la tarea de reconocimiento de objetos con objeto familiar y objeto novedoso).
4. Observar el número de neuronas granulares *NeuN* positivas que expresan la proteína de *Arc* en la prueba de retención de una memoria reciente y remota en la ejecución de la tarea de reconocimiento de objetos con objeto familiar y con objeto novedoso.
5. Determinar la ubicación de las células granulares *NeuN* positivas que presentan la proteína *Arc* en las diferentes capas de la capa granular del giro dentado en el hipocampo en los diferentes grupos experimentales (control, exploración de contexto, prueba de retención de la tarea de reconocimiento de objetos con objeto familiar y objeto novedoso).

## SUJETOS, MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo a los lineamientos bioéticos del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México para el uso de animales experimentales, de acuerdo con las normas estipuladas en la “*Guide for care and use of laboratory animals*” del instituto nacional de salud (sigla en inglés NIH) (1996).

**Animales.** Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 4 meses de edad (edad óptima para la ejecución de conductas), con un peso aproximado de 500 g, obtenidos del bioterio del Instituto de Neurobiología UNAM. Los animales fueron separados en cajas individuales con agua y comida *ad libitum*. Se mantuvieron en un cuarto sono- amortiguado con temperatura controlada entre 22 y 24 °C y bajo un ciclo invertido de 12:00-12:00 horas (oscuridad/luz), de 9 am-9 pm. Una vez que los animales se aclimataron al vivario del laboratorio, fueron manipulados durante 2 sesiones diarias, de 5 minutos cada una, por un periodo de 7 días. En las sesiones de manipulación, el animal fue extraído de la caja habitación y fue envuelto en una toalla dentro de la cual se introdujo la mano del investigador y fue acariciado, esta manipulación se realizó con el investigador de pie y en movimiento suave para acostumbrarlos al desplazamiento.

### Materiales y Métodos

#### Administración de BrdU

Los animales fueron inyectados intraperitonealmente con una dosis de BrdU de 200 mg/kg de peso del animal en 4 administraciones, cada 4 horas por día; durante un periodo de 7 días. El BrdU fue disuelto en solución salina 0.15 M, pH 8,5 a una temperatura de 37 °C.

Las ratas se mantuvieron en su caja habitación durante 45 días después de la última administración de *BrdU*, para su posterior experiencia conductual.

## **Tarea de reconocimiento de objetos**

La tarea de reconocimiento de objetos se realizó en un cuarto sono-amortiguado, con luz tenue (regulable), temperatura controlada (22-24 °C), con ruido blanco (gradiente de frecuencias entre 20 Hz y 20 KHz). Se utilizó una caja de campo abierto hecha en acrílico (45 x 45 x 45 cm), forrada externamente con foamy negro, con el piso cubierto de aserrín (1 cm). Se colocó una videocámara encima de la caja a nivel del techo del cuarto para grabar todas las sesiones conductuales. Los objetos a discriminar fueron focos blancos (6-cm diámetro y 11-cm largo) y frascos transparentes de vidrio (9, 13, 15 cm de alto y 4, 7, 8 cm de diámetro) (ver apéndice).

Cuando uno de los objetos fue presentado más de una vez a la rata, se utilizaron copias idénticas para evitar que el reconocimiento de los objetos hubiese sido por la representación del objeto *per se*. Todos los objetos se fijaron al piso con Velcro, para evitar que fueran desplazados por las ratas, los objetos fueron ubicados a 10 cm de la pared, separados entre ellos por una distancia de 8 cm .

Para evitar señales olfativas los objetos fueron limpiados con etanol al 70% y el aserrín de la caja fue removido después de cada ensayo. En cada sesión los animales fueron transportados al cuarto experimental 1 hora antes del inicio de cada sesión conductual y se dejaron 1 hora después de finalizar cada sesión con el fin de evitar condiciones de estrés que pudieran afectar la ejecución de la tarea, así como la consolidación de la misma.

Durante todas las fases, la rata fue ubicada en la caja mirando hacia la pared opuesta al lugar donde se colocaron los objetos, para evitar inducir alguna tendencia hacia alguno de los objetos.

Los animales fueron habituados (libre exploración) por 3 minutos diariamente, durante 5 días a la caja sin objetos en donde se ejecutó la tarea de reconocimiento de objetos, con el fin de disminuir mayoritariamente el estrés y/o ruido causado por la exploración del contexto que pudiera ser atribuido a la exploración de los objetos.

Durante la adquisición de la tarea de reconocimiento de objetos se colocaron 3 objetos a familiarizar por 10 minutos diariamente, durante 5 días; en cada sesión los objetos fueron cambiando de lugar para obtener combinaciones diferentes (Tabla 1), una vez terminada la sesión de 10 minutos los sujetos fueron colocados en su caja habitación. El número de objetos a discriminar fue incrementado con respecto a la tarea de reconocimiento normalmente reportada (2 objetos) con el fin de que el sujeto experimental tenga la posibilidad de tener un mayor número de patrones expuestos; pues según Weisz y Argibay (2009) en su modelo computacional muestra que a mayor número de patrones se observa una mayor recuperación de memorias recientes.

Sesión	Combinación	Objetos
1	A-B-C	A: Bombillo Espiral B: Bombillo Redondo C: Bombillo Herradura
2	B-C-A	
3	C-A-B	
4	B-A-C	
5	A-C-B	

**Tabla 1.** Combinaciones de objetos utilizadas en cada una de las sesiones de la fase de adquisición de la tarea de reconocimiento de objetos.

En la prueba de retención de la tarea de reconocimiento de objetos se cambia un objeto familiar por un objeto novedoso, la exploración fue por 3 minutos por sesión; se hicieron 3 sesiones con un intervalo de 10 minutos. En cada sesión los objetos fueron cambiados de lugar con el fin de obtener combinaciones diferentes, el novedoso fue diferente para cada sesión (Tabla 2).

Sesión	Combinación	Objeto Familiar	Objeto Novedoso
1	A-D-C	A: Bombillo Espiral	D: Frasco (Gerber)
2	B-A-E	B: Bombillo Redondo	E: Frasco 15 cm
3	F-C-B	C: Bombillo Herradura	F: Botella 10 cm

**Tabla 2.** Combinaciones de objetos utilizadas en cada una de las sesiones de la prueba de retención de la tarea de reconocimiento de objetos.

En la conducta de exploración se considera que el animal dirija su nariz en dirección del objeto a una distancia <1 cm y/o que lo toque con la nariz. Los animales que tengan un tiempo total de exploración <10 segundos, ya sea en la fase de adquisición o en la prueba de memoria, no se excluyeron del análisis aunque se ha reportado que estos animales no ejecutan

adecuadamente la tarea (Balderas et al., 2008), sin embargo son requeridos para observar si existe una correlación entre la eficiencia de ejecución de la tarea y el número de células que expresen Arc.

La tarea de reconocimiento de objetos fue analizada post ejecución, mediante la observación de los videos registrados. Se obtuvo un índice de exploración para cada objeto utilizado, mediante la fórmula:

$$\text{Índice de exploración} = \frac{\text{Tiempo de exploración objeto (x)}}{\text{Tiempo total de exploración de los objetos}}$$

Un índice de exploración superior a 0,333 en la prueba de retención para un objeto indica preferencia hacia ese objeto.

### **Sacrificio y extracción del cerebro**

Los sujetos experimentales fueron decapitados 60 minutos después la primera sesión de la prueba de retención de la tarea de reconocimiento de objetos. Los cerebros fueron extraídos rápidamente (120-180 segundos) y fueron sumergidos en 2-Metilbutano (sigma) contenido dentro de un vaso colocado en un baño de alcohol etílico natural en hielo seco. Los cerebros congelados fueron envueltos en papel aluminio en donde se marcaron los datos del animal y se almacenaron en un congelador a -70°C.

### **Bloqueo**

Con el uso de una matriz de acero inoxidable, fue cortado el cerebro congelado y se obtuvo un trozo de tejido nervioso de un solo hemisferio con 10 mm de grosor en el eje antero-posterior que contiene prácticamente todo el hipocampo (Fig. 19A). En los trabajos realizados en nuestro laboratorio no se ha observado diferencias en la proporción de células que expresan Arc después de la conducta entre los dos hemisferios. Por lo tanto, se pueden usar indistintamente o todos los hemisferios derechos o todos los hemisferios izquierdos de los animales de los diferentes grupos.

Cada trozo de tejido nervioso congelado que incluye el hipocampo de cada animal, se colocó en un molde de plástico (Electron Microscopy) en el que se pueden acomodar hasta 8 hemisferios (Fig. 19B), una vez colocados los 8 hemisferios se aplica medio crioprotector (OCT Tissue Tek) y se espera a que se congele rápidamente (comúnmente con la ayuda de hielo seco) (Fig. 19C). El producto de esta operación se considera un bloque de cerebros. Cada bloque de cerebros incluye un animal de los diferentes grupos, para aquellos experimentos en los que se tienen hasta 8 diferentes grupos, cada bloque incluirá un animal de cada uno de todos los grupos. En los experimentos en los que el número de grupos es mayor a 8 debido a la existencia de diferentes fases, se realizará un bloque por fase.

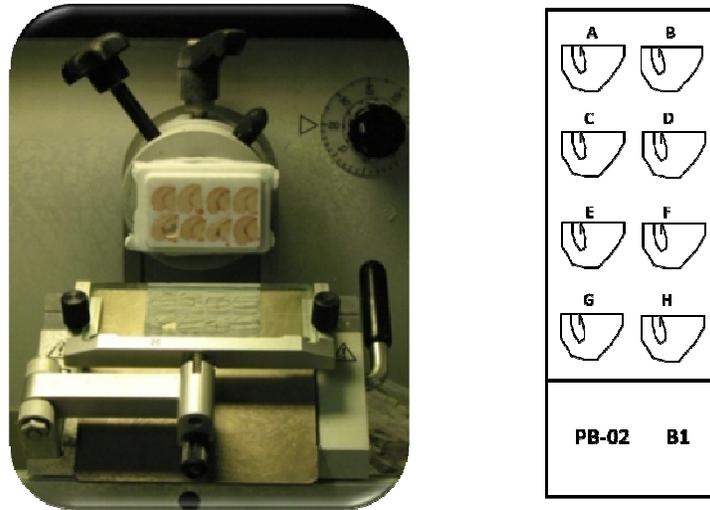


**Figura 19.** Proceso de elaboración del bloque. **A.** Seccionamiento de un cerebro en la matriz de acero inoxidable. **B.** Hemicerebros de 10mm de grosor que contienen el hipocampo en un molde de plástico. **C.** Molde de plástico que contiene 8 hemicerebros embebidos en un medio crioprotector OCT Tissue Tek. Fuente autor.

Este procedimiento nos permite tener todos los animales de los diferentes grupos en la misma laminilla después de la crío-sección y por lo tanto, podemos comparar con alta confiabilidad los resultados histológicos de los diferentes grupos de animales, reduciendo notablemente la variabilidad debida a los procedimientos histológicos.

### **Crio-sección**

Los bloques fueron seccionados a 20  $\mu\text{m}$  en un criostato (Fig. 20) a una temperatura entre  $-16^{\circ}\text{C}$  y  $-18^{\circ}\text{C}$ . Los tejidos fueron montados en laminillas silanizadas y se dejan secar durante un día a temperatura ambiente. Posteriormente las laminillas se guardaron en cajas envueltas en plástico para evitar que entre humedad y se almacenan en congeladores a  $-70^{\circ}\text{C}$  una semana antes de ser procesados para inmunohistoquímica.



**Figura 20.** Montaje del bloque en el criostato. En la izquierda se observa un bloque que contiene 8 hemisferos montado en el criostato, los cortes del tejido es de 20  $\mu\text{m}$ . En la derecha se observa un diagrama en el cual se ilustra la ubicación de los hemisferos en el bloque, a cada hemisfero se le asigna una letra para evitar manipulación de los datos. Fuente autor.

## Inmunohistoquímica

Se realizó un triple marcaje para detectar *NeuN* (marcador de neuronas maduras), *Arc* (proteína expresada por el gen de expresión temprana *arc*) y *BrdU* (marcador de proliferación celular).

Se tomaron 10 laminillas de cada bloque, las cuales contienen la parte dorsal del hipocampo, el cual fue identificado usando el atlas de Paxinos y Watson (1998) (Coordenadas antero-posteriores -3,14 a 4,3 con respecto a Bregma). El tejido es fijado en paraformaldehído al 2% pH 7.4 por 5 minutos, se lava en TBS (Trizma buffer solution) pH 7.0. Se bloquea la acción de la peroxidasa con  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 2 % disuelto en TBS por 15 minutos. Se bloquea con el sistema de amplificación de tiramida (TSA Perkin Elmer). Las laminillas se incuban secuencialmente con un anticuerpo hecho en ratón anti NeuN biotinilado (1:2000 Chemicon), la segunda detección es con un anticuerpo policlonal hecho en conejo que detecta *Arc* (1:500 que se obtiene del laboratorio del Dr. Paul Worley Universidad John Hopkins) y finalmente se detecta *BrdU* con un anticuerpo hecho en ratón anti BrdU monoclonal (1:100 ROCHE). Antes de la detección de *Arc* los tejidos se incuban en una solución fijadora y permeabilizadora de acetona con metanol 50:50 a 4°C por 5

minutos. Para la detección de BrdU el ADN se desnaturaliza con formamida al 50% disuelta en 2XSSC (Sigma) a 65 °C por dos horas, después se realizan lavados con 2XSSC por 10 minutos y se incuba en una solución de 2N HCl a 37°C por 30 minutos y finalmente se lava con 0.1 M de ácido bórico, pH 8.5 por 10 minutos. El anticuerpo para NeuN se detecta con el kit de amplificación AB (Vector). Para detectar el anticuerpo de Arc se utilizará un segundo anticuerpo biotinilado contra conejo hecho en cabra (Vector). Para la detección de BrdU se utiliza un anticuerpo anti-ratón biotinilado hecho en oveja, por ello, previo a la detección del anti-BrdU la IgG de ratón se bloquea con el sistema MOM de Vector (ratón en ratón) el cual permite detectar dos anticuerpos de ratón en el mismo tejido o bien detectar un anticuerpo hecho en ratón en tejido de ratón. La detección de Arc y BrdU se amplifica con el sistema AB (Vector) en donde la biotina esta peroxidada, pero antes de cada amplificación se bloquean tanto la avidina como la biotina previamente utilizada con el sistema de Bloqueo AB (Vector) por 15 minutos para cada bloqueo. Después de la amplificación con AB en cada uno de los anticuerpos, la señal se detectada con Cy5 para *NeuN*, Cy3 para *Arc* y FITC para *BrdU*, estos fluoroforos se obtienen del sistema TSA de Perkin Elmer. Finalmente se montan los cubre objetos con Vectashield (Vector).

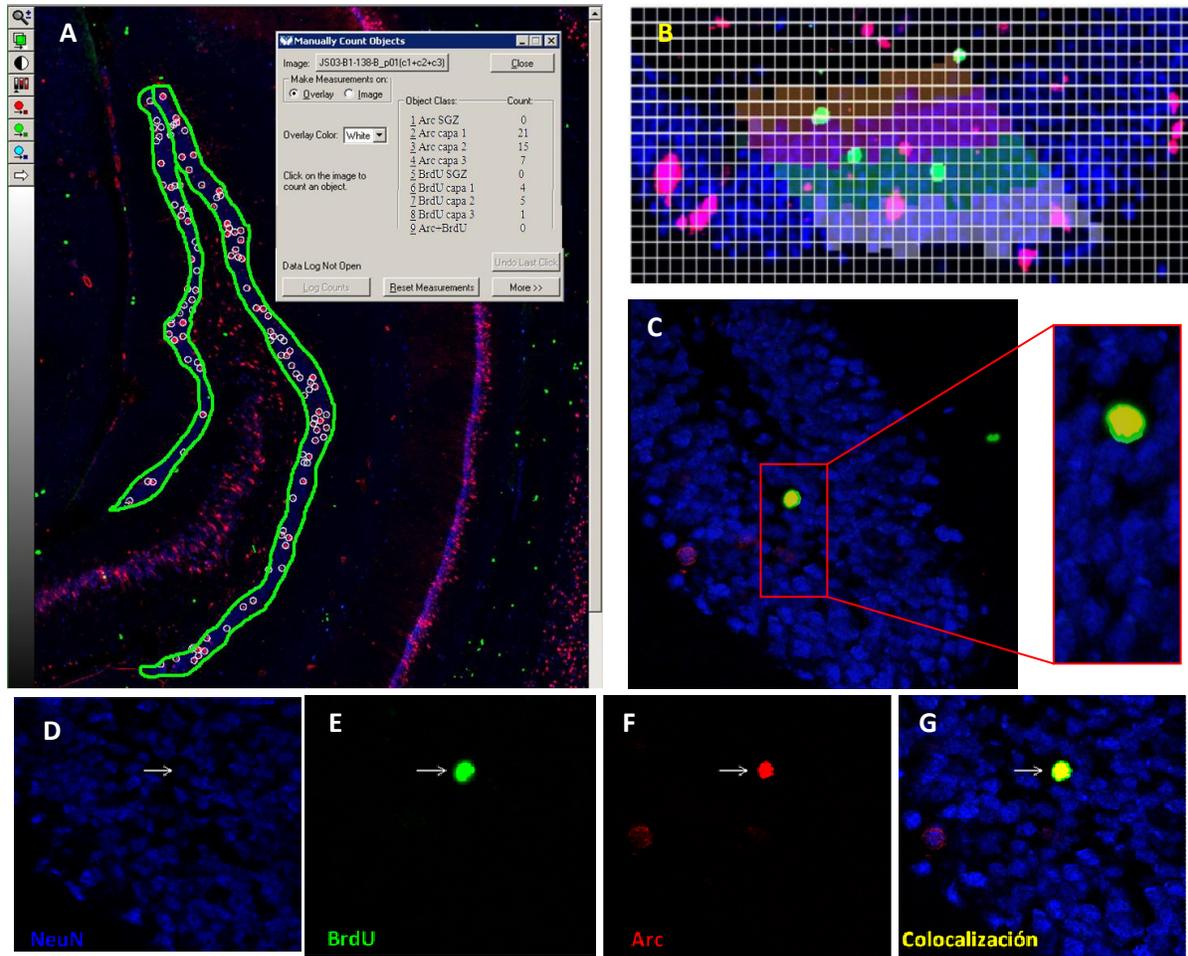
### **Mosaic X con el Apotome**

Con el fin de obtener imágenes completas del giro dentado se utilizó un microscopio semi-confocal Apotome marca Carl Zeiss Imager Z1, con una cámara AxioCamMR3. Debido a la escasa respuesta neuronal en el giro dentado, el número de células que expresan *Arc* es bajo. Por ello necesitamos tomar imágenes completas del giro dentado y así reducir el error que introduce el muestreo. Los parámetros para la obtención de imágenes en el Apotome se definieron en cada laminilla utilizando el animal control y se mantienen estables para la obtención de las imágenes en el resto de los animales. Actualmente estas imágenes se obtienen a partir de reconstrucciones en X y Y de 15 fotografías aproximadamente excitando con fluorescencia el tejido que tiene un grosor de 14-18 µm, capturando la imagen mediante un objetivo de 25X con 0.8 apertura numérica (AN).

En cada ocasión en la que se observe una colocalización entre *Arc*, *BrdU* y *NeuN*, se tomará una imagen en el microscopio confocal marca Zeiss LSM Meta, con un objetivo de 40X de 1.3 AN y

se realizará una reconstrucción 3D, en la cual se permite tener una mayor resolución tanto en Z como en los planos X y Y (Fig. 21).

Las imágenes se analizaron mediante el uso del software *Metamorph*® V 7.1.70 y el *ImageJ* de uso gratuito; en cada reconstrucción obtenida se midió el área que ocupa la banda de células granulares (superior, inferior), con el fin de calcular su volumen (Fig. 21).



**Figura 21.** Análisis de imágenes de GD obtenidos en el microscopio Apotome. **A.** Se muestra una imagen que contiene el GD en verde el área de la banda superior e inferior del GD, en los círculos se marcan cada una de las categorías celulares que se encuentran en el recuadro gris, objetivo 25X. **B.** Se muestra la rejilla con la cual se determina la posición en capas (capa 1, capa 2, capa 3 y SGZ) de las células granulares *Arc*<sup>+</sup>, *BrdU*<sup>+</sup> y *Arc*<sup>+</sup>/*BrdU*<sup>+</sup> en la capa granular del GD. **C. D. E. F. G** Se muestra una región del GD en donde se encuentra una célula granular que colocaliza los 3 marcadores *Arc* (rojo), *BrdU* (verde) y *NeuN* (azul), objetivo 40X. Fuente autor.

En las imágenes analizadas se realizó la clasificación de las células en donde se identifican aquellas positivas para *BrdU/NeuN*, positivas para *Arc/NeuN* y aquellas en las que co-localizan

los tres marcadores (*Arc/BrdU/NeuN*) ubicándolas en una de las 4 capas en las cuales ha sido dividida cada banda del GD (SGZ, Capa 1, Capa 2, Capa 3). El número de las células clasificadas se guardó en una imagen de referencia en Adobe Photoshop CS4, con la información obtenida de su área y su respectivo conteo celular (Fig. 21).

Una vez hecho el conteo celular se midió el coeficiente de *Gundersen*, el cual se considera como un valor estereológico para determinar el número mínimo de imágenes a analizar dependiendo de la variabilidad que encuentra en el conteo celular; en coeficiente para nuestro análisis, donde se utilizaron 10 imágenes por animal es de 0,4 considerado como confiable en términos de variabilidad estadística (ver fórmula y parámetros en el apéndice).

### **Análisis estadístico**

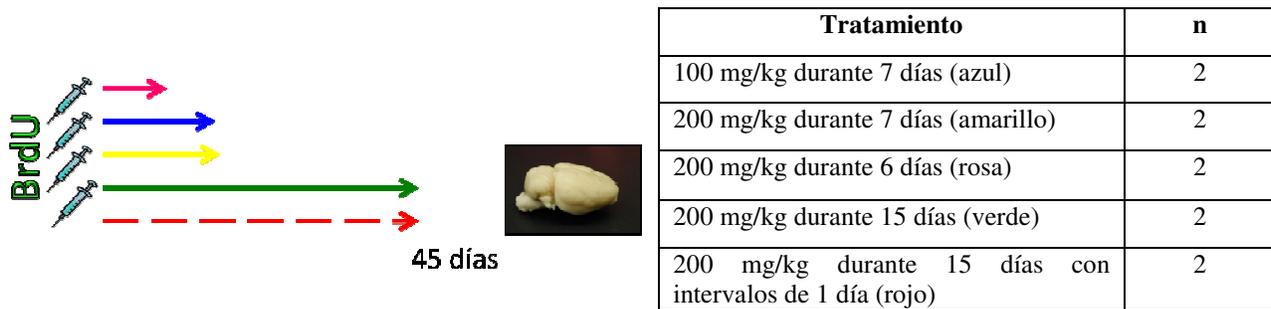
Se utilizó un análisis de varianza “ANOVA” de medidas repetidas para analizar los datos obtenidos tanto en la adquisición como en la prueba de retención de la tarea de reconocimiento de objetos. También se utilizó un análisis de varianza “ANOVA” de una vía donde se comparó la proporción de células que expresan *BrdU/NeuN*, *Arc/NeuN* y *Arc/BrdU/NeuN* con respecto a las diferentes condiciones conductuales. Se hizo una prueba post-hoc Fisher para observar las diferencias significativas entre grupos.

### **Protocolos**

#### **Experimento 1. Estandarización de la dosis de BrdU**

Este experimento se realizó con el fin de establecer la dosis de BrdU óptima para marcar un gran número de nuevas células en el cerebro de la rata adulta. Se utilizaron 8 ratas macho de la cepa Wistar de 4 meses de edad, con un peso de 450-500 g aproximadamente. El BrdU fue inyectado intraperitonealmente durante 6, 7, 15 días (un grupo con intervalo de 1 día y otro grupo sin

intervalo) en dos concentraciones diferentes, 200 mg/kg peso del animal y 100 mg/kg peso del animal, suministrado en 4 administraciones de 50 y 25 mg cada una respectivamente (Tabla 3).



**Tabla 3.** Diseño experimental del Piloto 1, donde los sujetos experimentales se inyectaron con diferentes dosis de BrdU total por día y por diferentes periodos de tiempo por grupo con su respectiva n. Después de cada tratamiento los animales se dejaron en su caja habitación durante 45 días.

Posteriormente los sujetos experimentales fueron sacrificados para la obtención de cerebros y así obtener tejidos en donde se llevó a cabo la tinción inmunohistoquímica para detectar las células *BrdU* positivas y *NeuN* positivas, seguido del análisis de imagenología y estadístico tal como se explica en el método.

## Experimento 2. Estandarización de la tarea de reconocimiento de objetos

Este experimento se llevó a cabo con el fin de determinar un protocolo adecuado donde los sujetos experimentales pudieran evocar una memoria tanto a las 24 horas como a los 7 días de la adquisición de la tarea de reconocimiento con tres objetos a familiarizar.

El experimento se realizó con 12 ratas macho de la cepa Wistar de 4 meses de edad, con un peso de 450-500g aproximadamente. Los animales fueron habituados al contexto sin objetos por 3 minutos (libre exploración) durante 5 días. Posteriormente en la fase de adquisición se le expusieron los 3 objetos a familiarizar durante 5 días en combinaciones de objetos diferentes (Tabla 4).

Grupo	Tratamiento	n
A	Habitación + Adquisición + Prueba de retención 24 horas	5
B	Habitación + Adquisición + Prueba de retención 7 días	5
C	Control de caja intacto	2

**Tabla 4.** Diseño experimental del experimento 2, en donde se hizo una prueba de retención a 24 h (A), a los 7 días (B) con un grupo control (C) y su respectiva n.

La prueba de retención se llevó a cabo a las 24 horas (memoria reciente) para el grupo A y a los 7 días (memoria remota) para el grupo B después de la última sesión de adquisición; durante la prueba se ejecutaron 3 sesiones en cada una se le colocó al animal 3 objetos, uno de ellos novedoso, los cuales fueron expuestos en combinaciones diferentes (Tabla 2) con una duración de 3 minutos, separadas entre ellas por 10 minutos; también se utilizaron 2 ratas que permanecieron en su caja habitación, las cuales no fueron sometidos a ningún tratamiento conductual (grupo C) . Los animales fueron sacrificados 60 minutos después del inicio de la primera sesión de la prueba de memoria de reconocimiento de objetos. Los datos fueron analizados como se explica en el método.

### **Experimento 3. Cuadrado latino: Tarea de reconocimiento de objetos**

El experimento de cuadrado latino (matriz de nxn objetos que se repite una vez por fila y por columna) se desarrolló con el fin de determinar si existe “saliencia” de los objetos *per se*, cuya notoriedad puede provocar en los sujetos experimentales preferencia en la exploración en los grupos de objetos seleccionados para la adquisición y la prueba de retención en la tarea de reconocimiento de objetos.

Los sujetos experimentales fueron habituados (como se muestra en el método), después fueron habituados al contexto sin objetos 3 minutos diariamente durante 5 días. Posteriormente se le presentó a cada sujeto experimental en una sesión de 6 ensayos cada uno de los objetos utilizados en la tarea de reconocimiento de objetos por 10 minutos cada ensayo. La exposición de los objetos se llevó a cabo de forma contrabalanceada, empleando un cuadrado latino (Tabla 5). Al inicio de cada uno de los ensayos se colocó aserrín limpio, así como el objeto de prueba, siempre

en la misma ubicación. Al concluir cada ensayo, la rata fue colocada en su caja habitación. Los objetos expuestos fueron limpiados con etanol al 70% y la caja de exploración con ácido acético con el fin de eliminar las pistas olfativas.

Sujeto	Objeto					
871	A	E	B	F	C	D
872	E	B	F	C	D	A
873	B	F	C	D	A	E
874	F	C	D	A	E	B
875	C	D	A	E	B	F
876	D	A	E	B	F	C

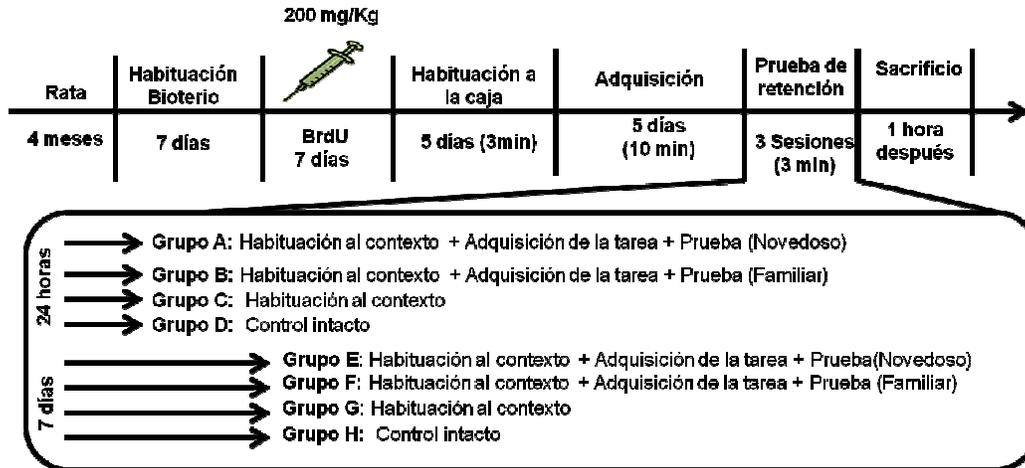
**Tabla 5.** Ejemplo de la exposición a objetos conocida como cuadrado latino. Objeto prueba presentado por ensayo en cada uno de los 6 ensayos en los seis sujetos experimentales utilizados en este experimento.

Cada uno de los ensayos fueron grabados y analizados post-exposición para su análisis. En cada uno de los ensayos se midió el tiempo de exploración al objeto (como se explica en el método).

**Experimento 4. Incorporación de las nuevas células granulares en la red hipocampal en la evocación de una memoria reciente y remota en la tarea de reconocimiento de objetos.**

El experimento fue dividido en dos fases, dado el número de animales que fueron utilizados. Para la primera fase, se utilizaron 18 ratas macho de la cepa Wistar de 4 meses de edad, con un peso de 450 g aproximadamente. En la segunda fase se utilizaron 30 ratas con las mismas características que se especificaron para los sujetos utilizados en la fase 1. Los sujetos experimentales fueron inyectados intraperitonealmente con BrdU a una concentración de 200 mg/kg del peso del animal en 4 administraciones diarias, durante 7 días.

Posteriormente fueron dejados en su caja habitación durante 45 días, tiempo en el cual se considera la integración de estas nuevas células (Sandoval et al., 2011). Transcurrido ese tiempo, los sujetos experimentales fueron sometidos a cada una de las fases conductuales de la tarea de reconocimiento de objetos tal como se especifica para cada grupo (Fig. 22) y en el método anteriormente al inicio de este apartado.



**Figura 22.** Diseño experimental. Se muestra el procedimiento que se llevó a cabo con los sujetos experimentales y el orden secuencial del desarrollo del experimento. n= 8 (Grupo A, B, E, F), n=4 (Grupo C, G), n=4(Grupo D, H).

En la fase de la prueba de retención se hicieron 3 pruebas por animal separadas por intervalos de 10 minutos cada una y en cada ensayo se cambió el orden de la ubicación de los objetos. Se hicieron 2 tipos de prueba de retención en grupos independientes. Tal como se muestra en la figura 17 a unos grupos experimentales se les hizo la prueba de evocación familiar en la cual no se le colocó al animal ningún objeto novedoso solo los 3 objetos familiares. A otros grupos se les hizo la prueba de retención con un objeto novedoso, en donde se cambia un objeto familiar por un objeto novedoso.

Una vez obtenidos los datos conductuales se elaboraron unas gráficas de desviación estándar en la exploración de los 3 objetos en las 5 sesiones de adquisición y en las 3 sesiones de la fase de prueba de retención, esto se hizo con el fin de identificar cuáles fueron los animales más eficientes en la ejecución de la tarea de reconocimiento de objetos con prueba de evocación familiar y novedosa, en la evocación de una memoria reciente y una memoria remota. Tanto en la adquisición como en la prueba de memoria con objeto familiar se comparó la variabilidad entre los tres objetos, sin embargo, para el caso de los animales a los cuales se les aplicó la prueba de memoria con objeto novedoso solo se comparó la variabilidad de los dos objetos familiares.

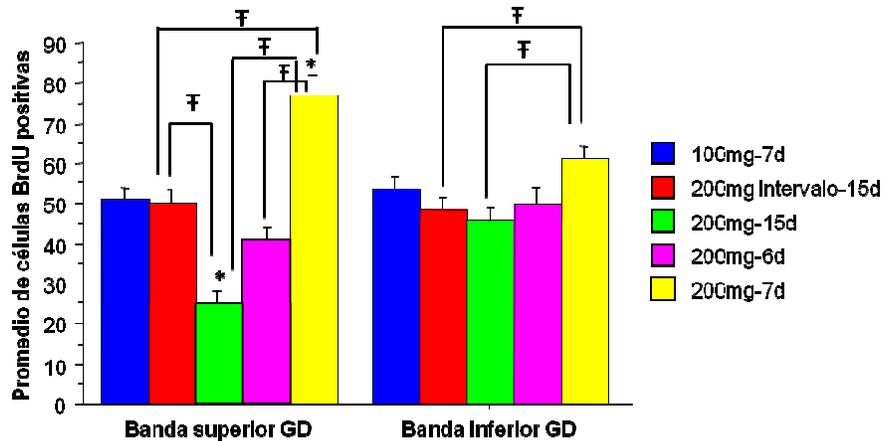
## RESULTADOS

### Experimento 1

#### Estandarización de la dosis de BrdU.

En el análisis cuantitativo de unidades neuronales, a partir de las fotografías obtenidas en el Apotome de las laminillas que fueron tratadas con inmunohistoquímica para *BrdU* (células nuevas) y *DAPI* (núcleos celulares), se encontraron diferencias significativas (ANOVA  $F_{(4,3)}=17.593$   $p<0.05$ ); entre el número de células nuevas en el tratamiento de 100 mg/kg de *BrdU* administrado durante 7 días con respecto a una concentración de 200 mg/kg de *BrdU* administrado durante 15 días ( $p<0.05$ ) también se encontraron diferencias entre 100 mg/kg de *BrdU* administrado en 7 días y 200 mg/kg de *BrdU* administrado en 7 días ( $p<0.05$ ); en aquellos animales a los que se les administró 200 mg/kg de *BrdU* durante 7 días tienen mayor número de nuevas neuronas con respecto a aquellos que fueron inyectados con 200 mg/kg de *BrdU* durante 15 días con intervalos de un día ( $p<0.05$ ); otras diferencias fueron encontradas entre las concentraciones de 200 mg/kg de *BrdU* administradas tanto en 7 como en 15 días ( $p<0.05$ ); de igual manera se encontraron diferencias entre 200 mg/kg de *BrdU* administrado en 7 días con respecto a la misma concentración que fue inyectada durante 6 días ( $p<0.05$ ) (Fig. 23).

Además, el número de neuronas analizadas en la banda inferior del giro dentado reflejan diferencias significativas (ANOVA,  $F_{(4,3)}= 6.114$   $p<0.05$ ) entre dos pares de grupos, los cuales se observaron en los animales que fueron inyectados con 200 mg/Kg de *BrdU* durante 7 días con respecto a aquellos a los que se les administró tanto 200mg/Kg de *BrdU* durante 15 días ( $p<0.05$ ) y a los que se les inyectó 200mg/Kg de *BrdU* administrado durante 15 días con intervalos de 1 día entre inyecciones ( $p<0.05$ ) (Fig. 23).



**Figura 23.** Promedio de las células granulares marcadas con BrdU en cada uno de los tratamientos, tanto en la banda superior como la banda inferior del giro dentado en el hipocampo. \* Diferencias significativas  $p < 0.05$  con respecto a 100 mg/kg; F  $p < 0.05$  Diferencias significativas entre grupos experimentales.

Dadas las diferencias significativas halladas estadísticamente entre los tratamientos administrados a los sujetos experimentales decidimos que la dosis de 200 mg/kg de BrdU administrada durante 7 días es la más adecuada para la obtención de un mayor número de nuevas neuronas marcadas tanto en la banda superior como la banda inferior del giro dentado.

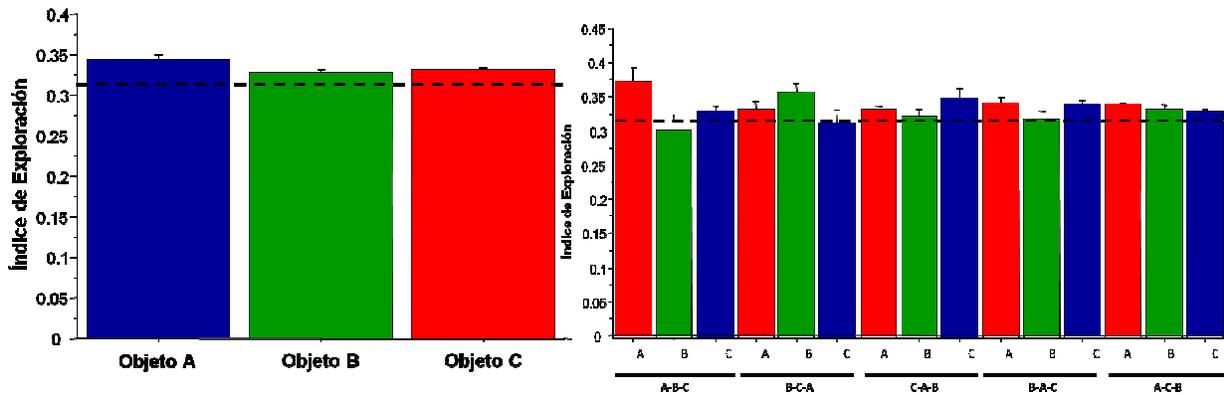
## Experimento 2.

### Estandarización de la tarea de reconocimiento de objetos.

Durante la estandarización de la tarea de reconocimiento de objetos, en la fase de adquisición no se encontraron diferencias significativas (ANOVA,  $F_{(8,2)} = 1.653$   $p > 0.05$ ) entre los índices de exploración de los objetos que fueron familiarizados (Fig. 24).

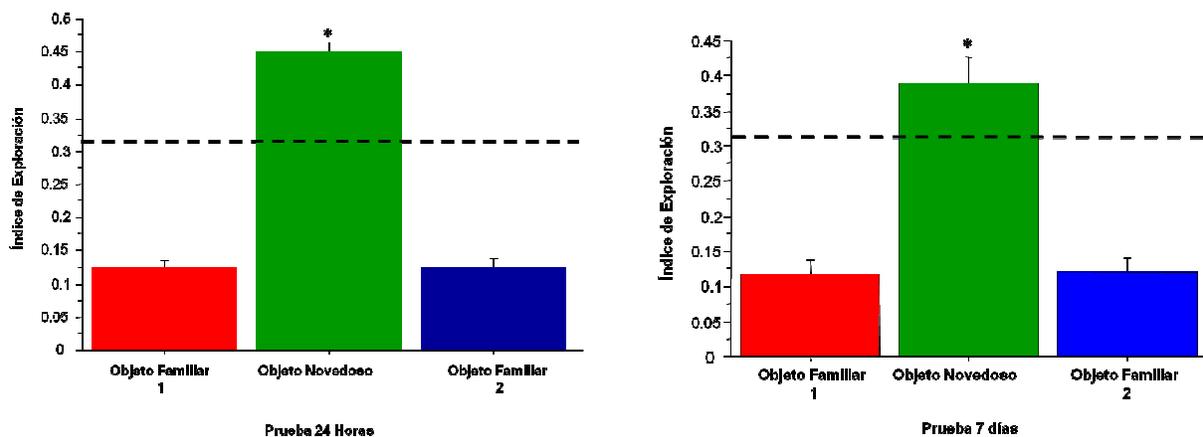
Tampoco se encontraron diferencias significativas en los índices de exploración de los tres objetos familiarizados en día 1 (ANOVA,  $F_{(8,2)} = 1.6854$   $p > 0.05$ ), día 2 (ANOVA,  $F_{(8,2)} = 1.646$   $p > 0.05$ ), día 3 (ANOVA,  $F_{(8,2)} = 1.020$   $p > 0.05$ ), día 4 (ANOVA,  $F_{(8,2)} = 1.799$   $p > 0.05$ ) y día 5 (ANOVA,  $F_{(8,2)} = 0.981$   $p > 0.05$ ) los cuales son equivalentes a diferentes combinaciones en la

exposición de objetos durante la fase de adquisición de la tarea de reconocimiento de objetos (Fig. 24).



**Figura 24.** A la izquierda índice de exploración para cada uno de los objetos utilizados durante la adquisición. No hay diferencias significativas en la exploración de cada objeto. A la derecha Índice de exploración para cada uno de los objetos familiarizados durante la adquisición. No hay diferencias significativas en la exploración de cada uno de los objetos en las diferentes combinaciones utilizadas en las diferentes sesiones de adquisición. La línea punteada indica el valor teórico del índice de exploración que debe tener cada objeto durante la fase de adquisición.

Sin embargo, en la prueba de prueba de retención se observaron diferencias significativas (ANOVA,  $F_{(8,2)} = 91.694$   $p < 0.0001$ ) en el índice de exploración del objeto novedoso con respecto a los dos objetos familiares ( $p < 0.0001$ ) tanto en la prueba de memoria de reconocimiento de objetos remota (7 días) como reciente (24 horas) (Fig. 25). Esto sugiere que la información adquirida durante el entrenamiento en la tarea de reconocimiento de objetos se mantiene hasta por 7 días, pese a que la tarea no involucra ningún tipo de reforzador.

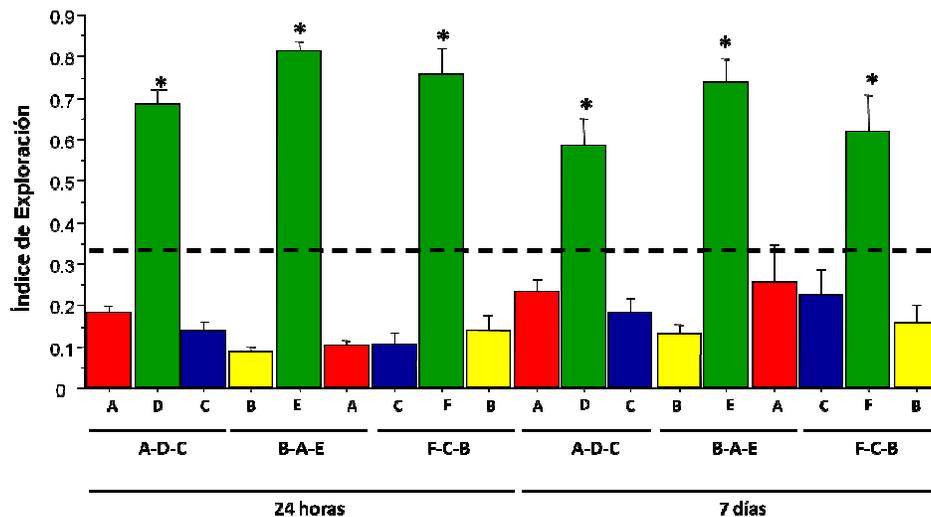


**Figura 25.** En la gráfica de la izquierda se muestra los índices de exploración obtenidos en la prueba de retención de una memoria reciente (24 horas). En la gráfica de la derecha se observa los índices de exploración obtenidos en la prueba de retención de una memoria remota (7 días). La línea punteada indica el valor que es superado por el objeto novedoso, mostrando así la preferencia por este objeto. \*  $p < 0.0001$  con respecto a los objetos familiares.

También se observaron diferencias significativas (ANOVA,  $F_{(8,2)}= 92.361$   $p<0.05$ ) en la exploración de los 3 objetos novedosos en la sesión 1 de la prueba de retención a las 24 horas de la última sesión de adquisición, siendo mayor la exploración para el objeto novedoso ( $p<0.05$ ); de igual manera se observó esta diferencia en la sesión 2 (ANOVA,  $F_{(8,2)}= 392.317$   $p<0.05$ ) y en la sesión 3 (ANOVA,  $F_{(8,2)}= 45.006$   $p<0.05$ ) de la prueba de retención, el objeto novedoso fue preferencial en la sesión 2 ( $p<0.0001$ ) y 3 ( $p<0.05$ ) con respecto a sus dos objetos familiares (Fig. 26).

Así mismo, se observaron dichas diferencias significativas después de transcurrido un periodo de 7 días después de la última sesión de adquisición en la sesión 1 (ANOVA,  $F_{(8,2)}= 15.946$   $p<0.05$ ), 2 (ANOVA,  $F_{(8,2)}= 24.118$   $p<0.05$ ) y 3 (ANOVA,  $F_{(8,2)}= 9.374$   $p<0.05$ ) de la prueba de retención; siendo el objeto novedoso el preferente para los sujetos experimentales ( $p<0.05$ ) (Fig. 26).

Estas diferencias se observaron pese a que todos los objetos hayan cambiado de posición durante cada sesión en cada una de las combinaciones expuestas al sujeto experimental en la prueba de memoria elaborada 24 horas y 7 días después de la última sesión de adquisición.



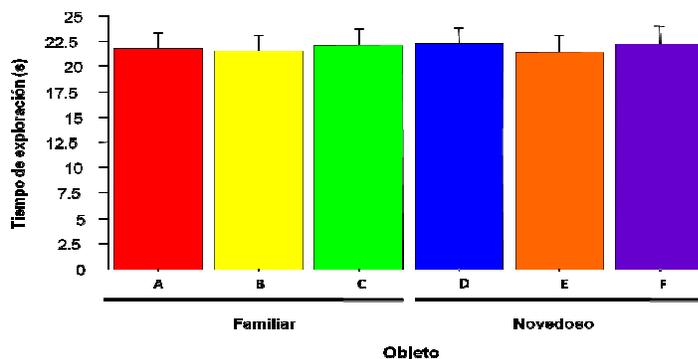
**Figura 26.** Índice de exploración para cada uno de los objetos expuestos durante la prueba de retención. Se muestran las diferencias significativas en la exploración del objeto novedoso con respecto a los otros dos objetos familiares en las diferentes combinaciones utilizadas. La línea punteada indica el valor (índice de exploración) que debe ser superado por el objeto novedoso durante la prueba de memoria remota (7 días) como reciente (24 horas). \*  $p<0.05$  con respecto a los objetos familiares de cada sesión.

Estos resultados nos indican que los objetos seleccionados para desarrollar la tarea de reconocimiento de objetos fueron adecuados y que las combinaciones utilizadas en cada sesión no tuvieron por sí mismas una preferencia en la exploración de los objetos. Además también pudimos examinar que los animales recuerdan la información adquirida en la tarea de reconocimiento de objetos desde 24 horas hasta por 7 días; aún teniendo en cuenta que esta tarea no tiene ningún tipo de reforzador que hace que la información se mantenga durante largos periodos de tiempo.

### Experimento 3.

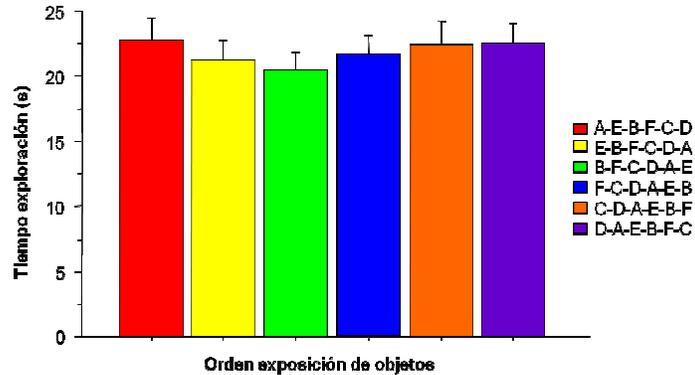
#### Cuadrado latino: Tarea de reconocimiento de objetos.

Una vez se le expusieron los 6 objetos utilizados en la tarea de reconocimiento de objetos a cada uno de los sujetos experimentales no se encontraron diferencias significativas (ANOVA medidas repetidas,  $F_{(5,25)}=0.239$   $p=0.9413$ ) en cada uno de los 6 objetos que fueron explorados por cada uno de los sujetos experimentales, los cuales fueron utilizados como objetos familiares (A, B, C) y objetos novedosos (D, E, F) (Fig. 27).



**Figura 27.** Tiempo de exploración en segundos para cada uno de los objetos que fueron utilizados como familiares y novedosos en la adquisición y prueba de retención. No hay diferencias significativas.

Tampoco se encontraron diferencias significativas (ANOVA medidas repetidas,  $F_{(5,25)}=1.719$   $p=0.1569$ ) en el orden en el cual se expusieron los objetos a los sujetos experimentales durante la sesión de exploración (Fig. 28).



**Figura 28.** Cuadrado latino. Promedio del tiempo de exploración en segundos para cada uno de los objetos en diferente orden en el cual fueron expuestos a los sujetos experimentales en cada una de las sesiones de adquisición. No hay diferencias significativas.

No se encontró preferencia *per se* en la exploración de los objetos empleados en la tarea de reconocimiento de objetos ni en el orden en el cual fueron expuestos.

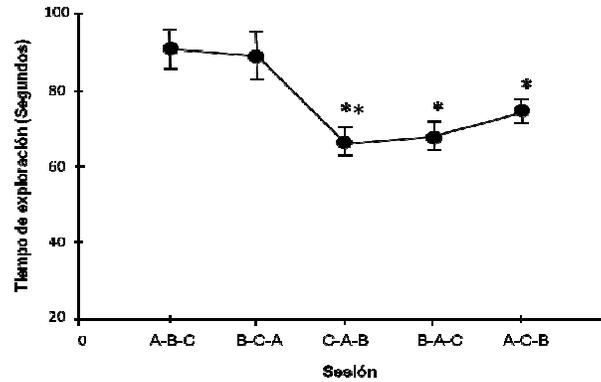
#### Experimento 4.

**Incorporación de las nuevas células granulares en la red hipocampal en la evocación de una memoria reciente y remota en la tarea de reconocimiento de objetos.**

#### Resultados conductuales.

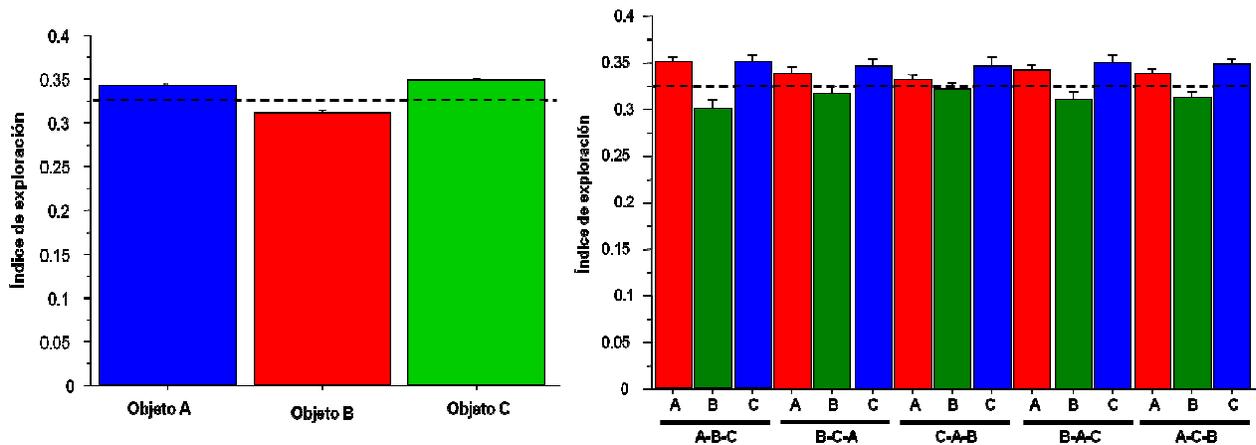
**Adquisición TRO.** Una vez analizados los tiempos que exploraron las ratas durante la adquisición de la tarea de reconocimiento de objetos se observó la curva de aprendizaje, en la cual se observa un decremento de la respuesta (una disminución en el tiempo de exploración) a medida que transcurren las sesiones de entrenamiento (Fig. 29).

Se observaron diferencias significativas (ANOVA de medidas repetidas,  $F_{(4,128)} = 8.6145$   $p < 0.0001$ ) en el tiempo de exploración en la sesión 1 y 2 con respecto a la sesión 3 ( $p < 0.0001$ ), 4 ( $p < 0.05$ ) y 5 ( $p < 0.05$ ) (Fig. 29).



**Figura 29.** Curva de aprendizaje de la tarea de reconocimiento de objetos en cada una de las 5 sesiones de adquisición. \*\* $p < 0.0001$ , \*  $p < 0.05$  con respecto a la sesión 1 y 2 de entrenamiento..

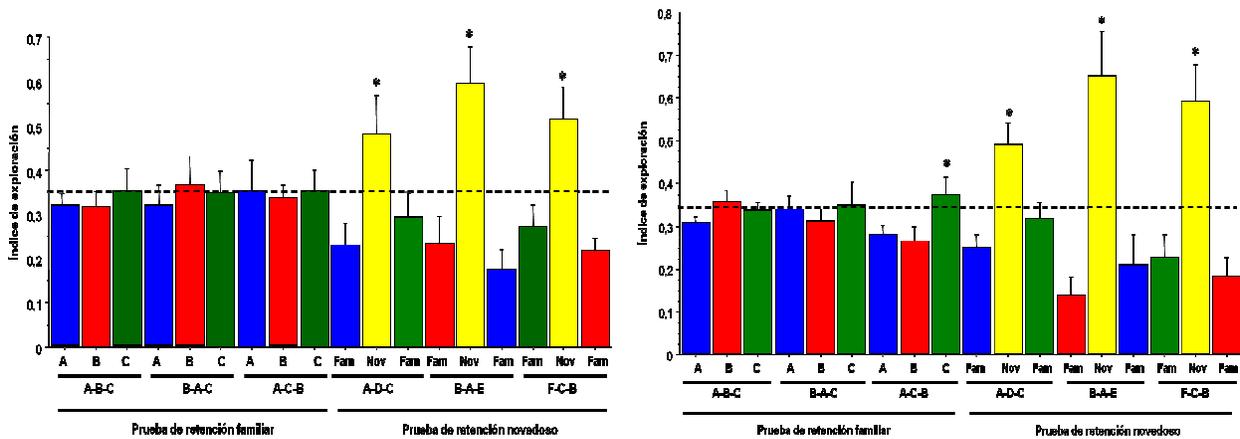
En la fase de adquisición no se encontraron diferencias significativas (ANOVA medidas repetidas,  $F_{(2,31)}=2.557$   $p=0.857$ ) en el índice de exploración de los objetos a familiarizar (A, B, C). Tampoco se encontraron diferencias significativas (ANOVA medidas repetidas,  $F_{(2,31)}=1.830$   $p=0.1691$ ) en el índice de exploración de los objetos a familiarizar en ninguna de las 5 combinaciones que fueron expuestas a los sujetos experimentales (Fig. 30).



**Figura 30.** A la izquierda se observa el índice de exploración de cada uno de los objetos familiarizados en las 5 sesiones de la adquisición de la tarea de reconocimiento de objetos. A la derecha se observa el índice de exploración para cada uno de los objetos en cada una de las 5 sesiones de la fase de adquisición. La línea punteada indica el índice de exploración óptimo para la familiarización de los objetos (0.33). No hay diferencias significativas.

**Prueba de retención TRO.** En la prueba de retención ejecutada 24 horas después de la última sesión de adquisición se encontraron diferencias significativas (ANOVA medidas repetidas,  $F_{(2,31)}= 9.374$   $p < 0.05$ ), de igual manera se encontraron diferencias significativa (ANOVA medidas repetidas,  $F_{(2,31)}= 2.765$   $p < 0.05$ ) en la prueba de retención 7 días después de la última

sesión de adquisición en el índice de exploración del objeto novedoso con respecto a sus dos objetos familiares, en la sesión 1, 2 y 3 ( $p < 0.05$ ) de la prueba de objeto novedoso (Fig. 31).

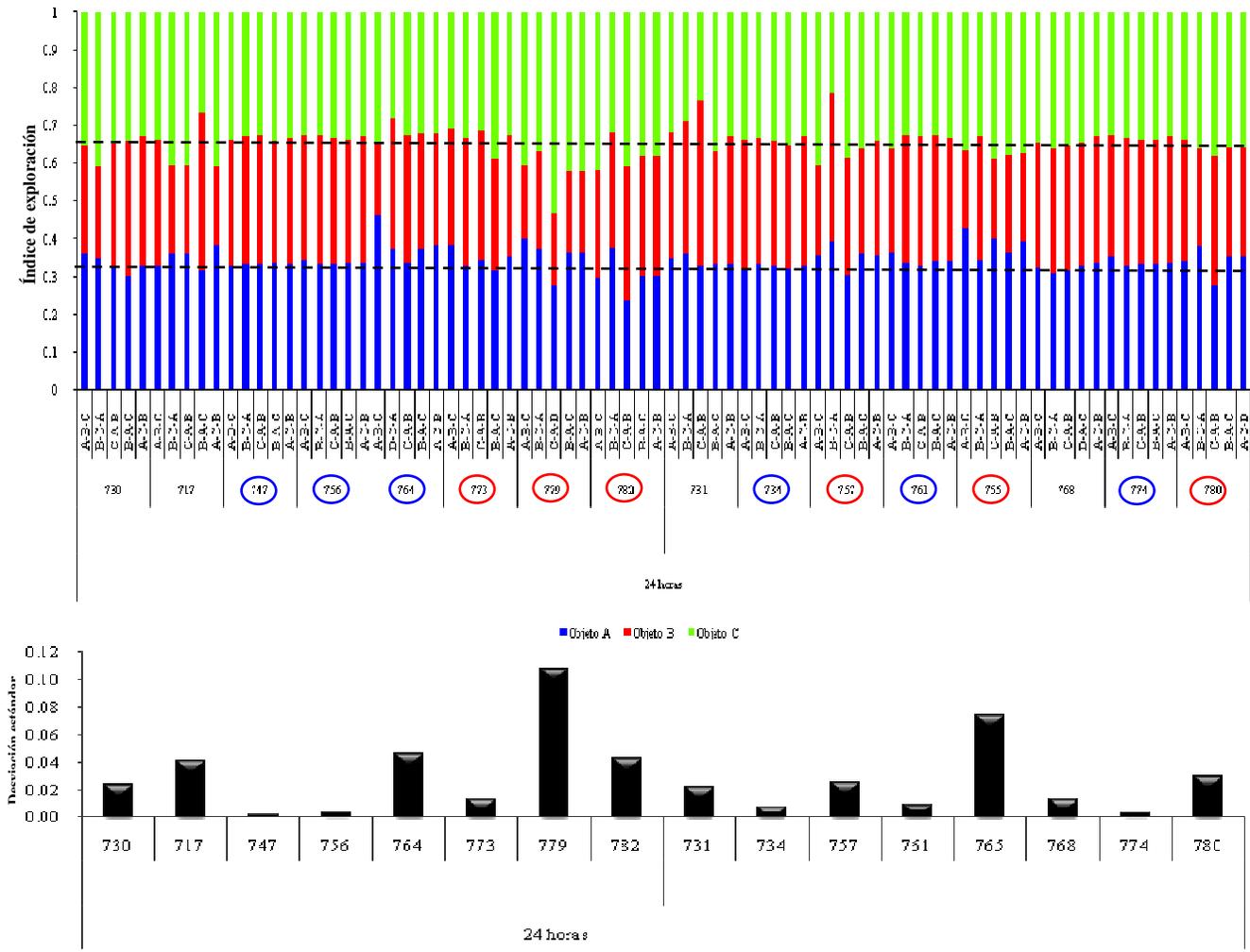


**Figura 31.** A la izquierda se observa el índice de exploración de cada uno de los objetos utilizados en las 3 sesiones de prueba de retención en una memoria reciente (24 h) de la tarea de reconocimiento de objetos. A la derecha se observa el índice de exploración de cada uno de los objetos utilizados en las 3 sesiones de prueba de retención en una memoria remota (7 d) de la tarea de reconocimiento de objetos. La línea punteada indica el índice de exploración que debe ser superado por el objeto novedoso para ser preferente. \*  $p < 0.05$  con respecto a los objetos familiares.

No se encontraron diferencias significativas (ANOVA medidas repetidas,  $F_{(4,15)}=0.442$   $p=0.5145$ ), en la exploración de los objetos en las 3 sesiones ejecutadas en la prueba de retención de una memoria reciente (24 h) y una memoria remota (7 d).

**Adquisición por sujeto experimental.** Durante la fase de adquisición se muestra el índice de exploración para cada objeto en cada una de las sesiones de entrenamiento para cada animal que fue seleccionado para la prueba de retención de 24 horas después de la última sesión de adquisición, esto se hizo con el fin de determinar el comportamiento individual de los animales en la fase de adquisición (Fig. 32).

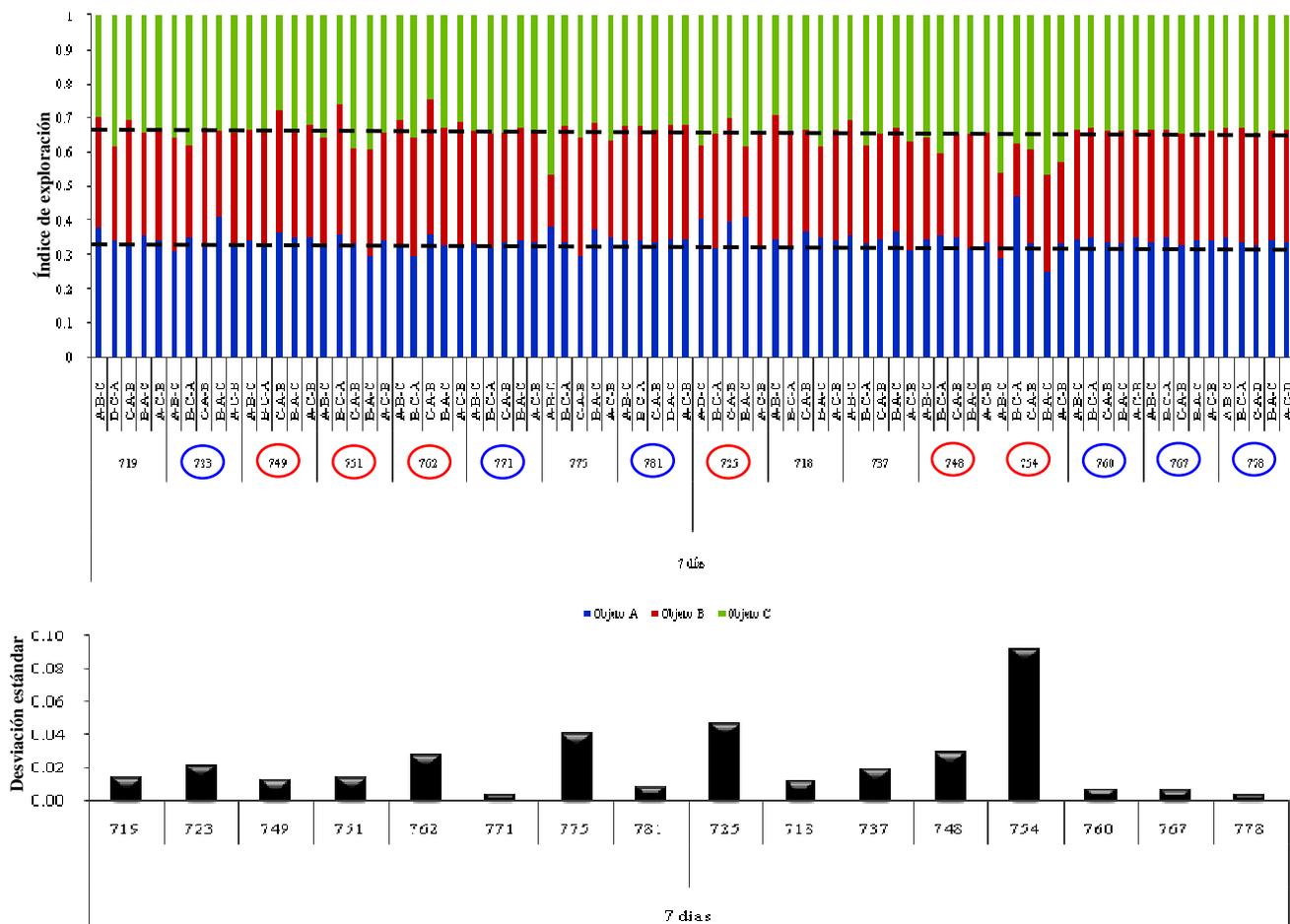
Algunos sujetos experimentales que aprendieron de forma correcta durante las 5 sesiones de adquisición, sin embargo, también encontramos animales que no familiarizaron bien la tarea de reconocimiento de objetos, tal es el caso de los animales 779, 782, 773, 757, 765 y 780, en los cuales los índices de exploración de cada uno de los objetos superó el 0.33, mostrando una preferencia por uno o dos objetos en cada una de las sesiones (Fig. 32).



**Figura 32.** Fase de adquisición de la tarea de reconocimiento de objetos para el grupo de 24 horas. En la parte superior se grafica el índice de exploración para el objeto A, B y C durante las 5 sesiones de entrenamiento por animal. Las líneas punteadas indican el índice de exploración ideal para cada objeto. En la parte inferior de la gráfica se muestra la variabilidad en desviación estándar de los animales en la exploración de los 3 objetos a familiarizar.

Con los índices de exploración de los objetos A, B y C se determinó la variabilidad (desviación estándar) con la que los animales exploraron cada uno de los objetos en las 5 sesiones encontrando una gran variabilidad en el desempeño durante la adquisición de la tarea de reconocimiento de objetos, hallando sujetos experimentales en los cuales se adquirió de manera correcta la tarea como por ejemplo la rata 747, 774 y 756; también se halló el caso contrario, animales que no lograron familiarizar de manera correcta los 3 objetos como es el caso de los animales 779, 765 y 782 (Fig. 32).

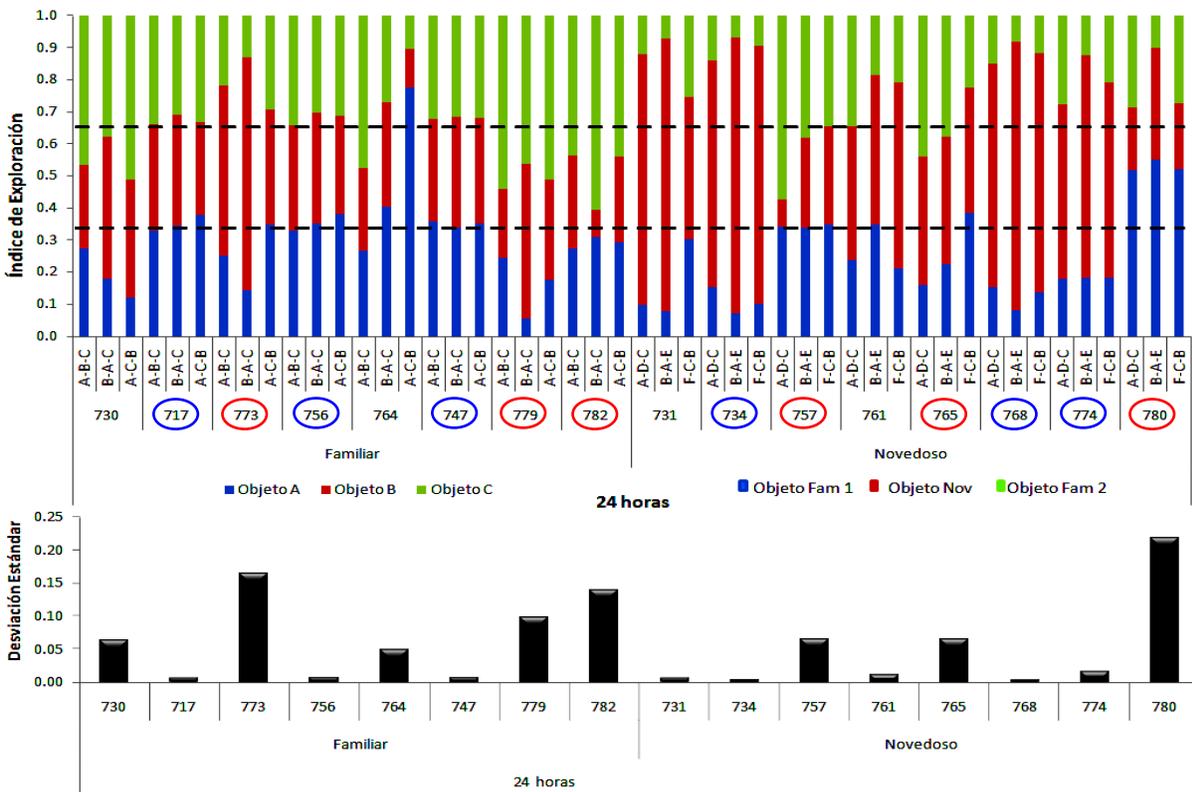
En la fase de adquisición se muestra el índice de exploración para cada objeto en cada una de las sesiones de entrenamiento para cada animal que pertenecen al grupo al cual se les hizo la prueba de retención 7 días después de la última sesión de adquisición, esto se hizo con el fin de determinar el comportamiento individual de los animales en esta fase (Fig. 33). Algunos sujetos experimentales se comportaron de una manera normal durante las 5 sesiones de adquisición, sin embargo también encontramos animales que no familiarizaron bien la tarea de reconocimiento de objetos, tal es el caso de los animales 749, 751, 762, 725, 748 y 754, los cuales tienen un índice mayor o menor de 0.33 para uno o dos objetos, lo cual se refleja en una preferencia (Fig. 33).



**Figura 33.** Fase de adquisición de la tarea de reconocimiento de objetos para el grupo de 7 días. En la parte superior se grafica el índice de exploración para el objeto A, B y C durante las 5 sesiones de entrenamiento por animal. Las líneas punteadas indican el índice de exploración ideal para cada objeto. En la parte inferior de la gráfica se muestra la variabilidad en desviación estándar de los animales en la exploración de los 3 objetos a familiarizar.

Usando los índices de exploración de los objetos A, B y C se determinó la variabilidad (desviación estándar) con la que los animales exploraron cada uno de los objetos en las 5 sesiones encontrando una gran variabilidad en el desempeño durante la adquisición de la tarea de reconocimiento de objetos, hallando sujetos experimentales en los cuales se adquirió de manera correcta la tarea como por ejemplo la rata 771, 781 y 778; también se halló el caso contrario, animales que no lograron familiarizar de manera correcta los 3 objetos como es el caso de los animales 754, 725 y 762 (Fig. 33).

**Prueba de retención por sujeto experimental.** En la prueba de retención realizada a las 24 horas después de la última sesión de adquisición tanto con objeto familiar como con objeto novedoso se encontraron animales que ejecutaron de manera adecuada la tarea conductual y otros que no lograron hacerlo, en la mayoría de los casos los animales eficientes y no eficientes coinciden con aquellos que familiarizaron bien los tres objetos durante la adquisición (Fig. 34).



**Figura 34.** Prueba de retención ejecutada 24 horas después de la última sesión de adquisición. En la parte superior se grafica el índice de exploración para el objeto A, B y C (para prueba con objeto familiar) y objeto novedoso y familiar 1 y 2 (para prueba con objeto novedoso) durante las tres pruebas aplicadas a cada animal. Las líneas punteadas indican el índice de exploración ideal para cada objeto. Los óvalos rojos representan a los animales que ejecutaron poco eficientemente la tarea y los óvalos azules representan a aquellos animales que ejecutaron de manera eficiente la tarea de reconocimiento de objetos.

En la prueba de retención con objeto familiar se obtuvo que los animales que ejecutaron bien la tarea de reconocimiento de objetos tuvieron índices de exploración para cada objeto cercano al 0.33, en los animales cuya ejecución no fue correcta se encontró que en uno o dos objetos había preferencia por el mismo incrementando el índice de exploración de 0.33 (Fig. 34).

Sin embargo, a los sujetos experimentales a los cuales se les aplicó una prueba con objeto novedoso se encontró que algunos de ellos ejecutaron muy bien la tarea conductual, lo cual se vio reflejado en el incremento en el índice de exploración del objeto novedoso con respecto a los dos objetos familiares alcanzando índice de exploración de 0.8 para el objeto novedoso como es el caso de la rata 734.

No obstante, se encontraron animales que no ejecutaron bien la tarea de reconocimiento de objetos lo cual se observó de dos formas, en la primera animales como la rata 780 presentaron una preferencia por uno de los objetos familiares incluso del 0.7. En la segunda observación animales como la rata 765 mostraron un índice de exploración cercano al 0.33 para los tres objetos (Fig. 34).

En la prueba de retención ejecutada 7 días después de la última sesión de adquisición tanto con objeto familiar como con objeto novedoso se encontraron animales que ejecutaron de manera adecuada la tarea conductual y otros que no lograron hacerlo, en la mayoría de los casos los animales eficientes y no eficientes coinciden con aquellos que familiarizaron bien los tres objetos durante la adquisición (Fig. 35).

En la prueba de retención con objeto familiar se obtuvo que los animales que ejecutaron bien la tarea de reconocimiento de objetos tuvieron índices de exploración para cada objeto cercano al 0.33, en los animales cuya ejecución no fue correcta se encontró que en uno o dos objetos había preferencia por el mismo incrementando el índice de exploración de 0.33 (Fig. 35).



eficientemente y aquellos que no fueron eficientes en la ejecución de la tarea de reconocimiento de objetos teniendo en cuenta la variabilidad (desviación estándar) en el índice de exploración de cada uno de los objetos, es decir, se consideraron animales eficientes a aquellos que no presentaban una alta variabilidad en el índice de exploración tanto en las 5 sesiones de adquisición como en las 3 sesiones de prueba y como no eficientes a los cuales presentaron una alta variabilidad en la exploración de los objetos tanto en las sesiones de adquisición como de prueba de retención (círculos azules y rojos en las figuras 32, 33, 34, 35).

En el caso de la adquisición y de la prueba de retención con objeto familiar se obtuvo la variabilidad en la exploración de los 3 objetos familiares, pero en la prueba de retención de objeto novedoso sólo se evaluó la variabilidad en los 2 objetos familiarizados. Esto se debe a que si se hubiera tenido en cuenta el objeto novedoso se hubiera incrementado la variabilidad así el animal hubiera ejecutado la tarea eficientemente.

A continuación se muestra el resumen de los animales que fueron considerados para el análisis inmunohistoquímico de las células *Arc+ BrdU+* y *NeuN+* en el GD de la rata adulta en la tarea de reconocimiento de objetos (Tabla 6).

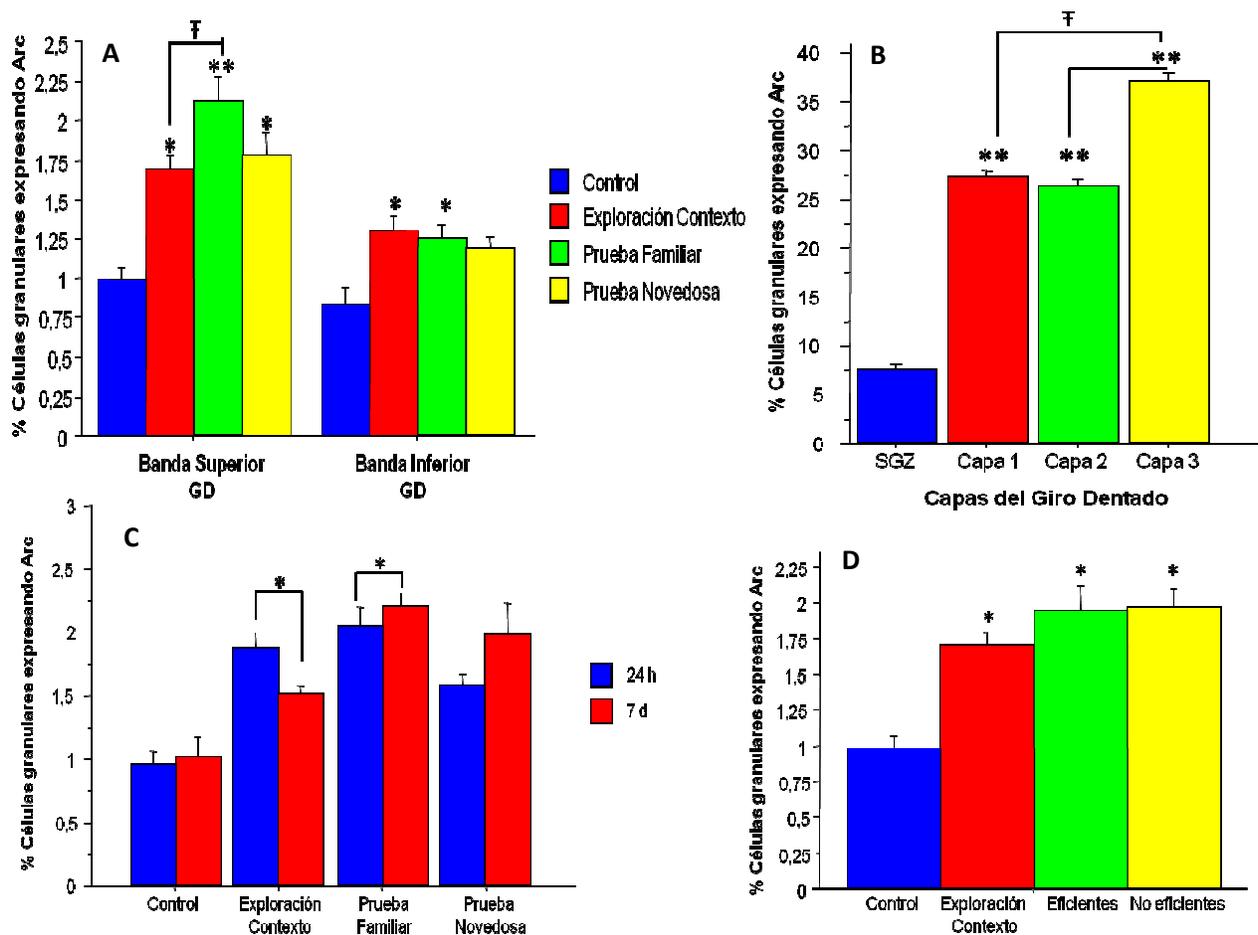
<b>Grupo</b>	<b>Ratas eficientes</b>	<b>Ratas no eficientes</b>
24 h- Prueba objeto Familiar	747, 756, 717	779, 773, 782
24 h- Prueba objeto Novedoso	734, 768, 774	757, 765, 780
7 días- Prueba objeto Familiar	771, 781, 723	762, 751, 749
7 días- Prueba objeto Novedoso	778, 760, 767	725, 748, 754

**Tabla 6.** Sujetos experimentales seleccionados para el análisis inmunohistoquímico pertenecientes a 4 grupos experimentales con n=3 para cada grupo tanto eficientes como no eficientes.

## **Resultados histológicos.**

**Expresión de la proteína *Arc* en las células granulares (*NeuN+*) totales en el GD.** En el análisis de las células granulares que expresan la proteína *Arc* en el giro dentado se encontraron

diferencias significativas (ANOVA,  $F_{(3,32)}=6.803$   $p=0.011$ ), en la banda superior del GD, se encontró que el 1.7% de las células granulares presentan la proteína *Arc* en aquellos sujetos que exploraron el contexto ( $p<0.05$ ), 2.2% de células granulares respondieron expresando *Arc* en la prueba de retención con objeto familiar ( $p<0.0001$ ) y 1.8% de células granulares respondieron ante la prueba de memoria con objeto novedoso ( $p<0.05$ ) con respecto a su control intacto que presentó cerca del 1%. Además, se observó un mayor porcentaje de células *Arc*(+) en los animales que ejecutaron la prueba de retención con objeto familiar con respecto a los animales que solo exploraron el contexto ( $p<0.05$ ) (Fig. 36).



**Figura 36.** Expresión de la proteína *Arc* en las células granulares del GD. **A.** Se muestra la expresión de la proteína de *Arc* en las células granulares en la banda superior y en la banda inferior del GD en una prueba de memoria con objeto familiar y objeto novedoso, exploración de contexto y control (intacto) en la tarea de reconocimiento de objetos. **B.** Se observa la expresión de la proteína de *Arc* en las células granulares en las diferentes capas del GD (promedio de todos los grupos). **C.** Se muestra el porcentaje de las células granulares que expresan la proteína de *Arc* en las células granulares en la banda superior del giro dentado en una prueba de memoria reciente (24 horas) y de memoria remota (7 días) de la tarea de reconocimiento de objetos en cada uno de los grupos experimentales. **D.** Se muestra el porcentaje de células que presentan la proteína *Arc* en animales que ejecutaron la tarea de reconocimiento de objetos de manera eficiente y no eficiente. Todas las células granulares analizadas son *NeuN* positivas. \* $p<0.05$  con respecto al control (A, C, D) y con respecto a la SGZ (B); \*\*  $p<0.0001$  con respecto al control; **F**  $p<0.05$  entre grupos.

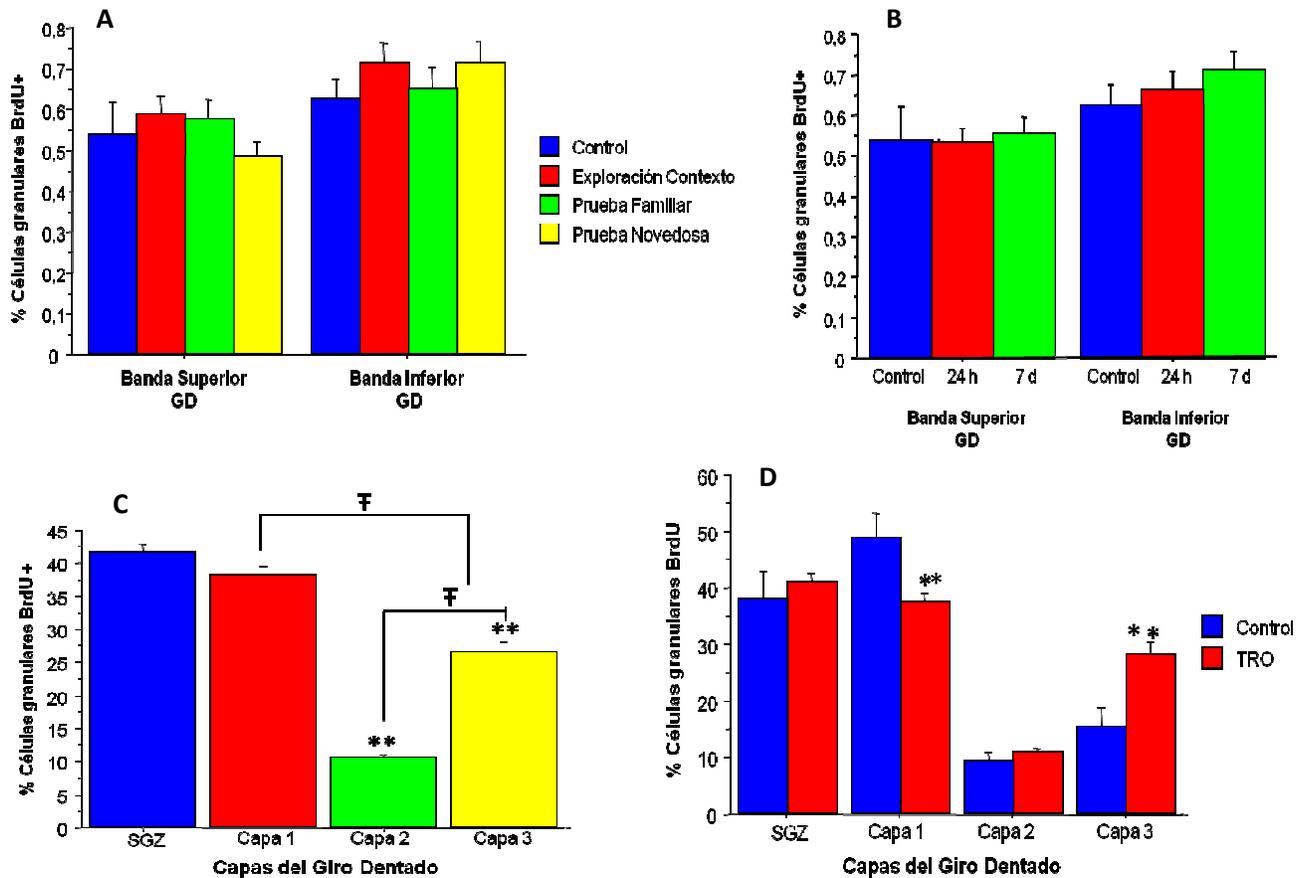
También se encontraron diferencias significativas (ANOVA,  $F_{(3,32)}=2.431$   $p=0.044$ ), en el porcentaje de células granulares que expresan la proteína *Arc* en la banda inferior del GD, el 1.3% de las neuronas granulares expresan *Arc* ante la exploración del contexto ( $p<0.05$ ) y el 1.27% de células granulares expresan *Arc* en la prueba de memoria con objeto familiar ( $p<0.05$ ) con respecto a su control intacto que indujo la traducción de la proteína *Arc* en el 0.8% de las células granulares de la capa inferior del GD (Fig. 36).

Las células que expresan la proteína *Arc* se ubican en diferentes capas de la capa granular en la banda superior del GD; se encontraron diferencias significativas (ANOVA,  $F_{(35)}=385.627$   $p<0.0001$ ) en su distribución, el 27.5% de las células granulares expresan *Arc* en la capa 1, ( $p<0.0001$ ), el 26.5% en la capa 2 ( $p<0.0001$ ) y el 37.5% en la capa 3 ( $p<0.0001$ ) del GD con respecto a la zona subgranular que tiene el 7.5% de las células granulares expresando *Arc*, sin embargo, es mayor significativamente el porcentaje de células granulares que se encuentra en la capa 3 ( $p<0.0001$ ) con respecto a las demás capas (Fig. 36).

En la banda superior del GD se encontró (ANOVA,  $F_{(3,32)}=7.594$   $p=0.0330$ ) un mayor porcentaje de células granulares expresando la proteína *Arc* en aquellos animales que exploraron el contexto sin objetos 24 horas ( $p<0.05$ ) después de su última sesión de exploración con respecto a aquellos que exploraron 7 días después. También observamos un mayor porcentaje de células granulares que presentan la proteína *Arc* (ANOVA,  $F_{(3,32)}=7.812$   $p=0.049$ ), en la prueba de retención con objeto familiar ejecutada 7 días después de la última sesión de adquisición con respecto a aquellas que la ejecutaron a las 24 horas (Fig. 36).

Se encontraron diferencias significativas (ANOVA,  $F_{(3,32)}=5.040$   $p=0.0057$ ) en el porcentaje de células granulares que expresan *Arc* en los animales que exploraron el contexto ( $p<0.05$ ), que ejecutaron la tarea de reconocimiento de objetos de forma eficiente ( $p<0.05$ ) y no eficiente ( $p<0.05$ ) con respecto a su control intacto (Fig. 36), siendo un 1.9% para los animales eficientes y no eficientes, 1.7% para los sujetos que exploraron el contexto y 1% para el control intacto.

**Células granulares *BrdU/NeuN* positivas en el GD.** Se cuantificó el porcentaje de células *BrdU* en la banda superior e inferior del GD, no se encontró diferencia significativa en el porcentaje de células nuevas (*BrdU*+) en los diferentes grupos experimentales en la banda superior (ANOVA,  $F_{(3,32)}=0.976$   $p=0.4163$ ) ni en la banda inferior (ANOVA,  $F_{(3,32)}=0.534$   $p=0.6621$ ), se encontró 0.55% de neuronas nuevas en el GD en promedio en la banda superior y 0.68% aproximadamente en la banda inferior del GD (Fig. 37).



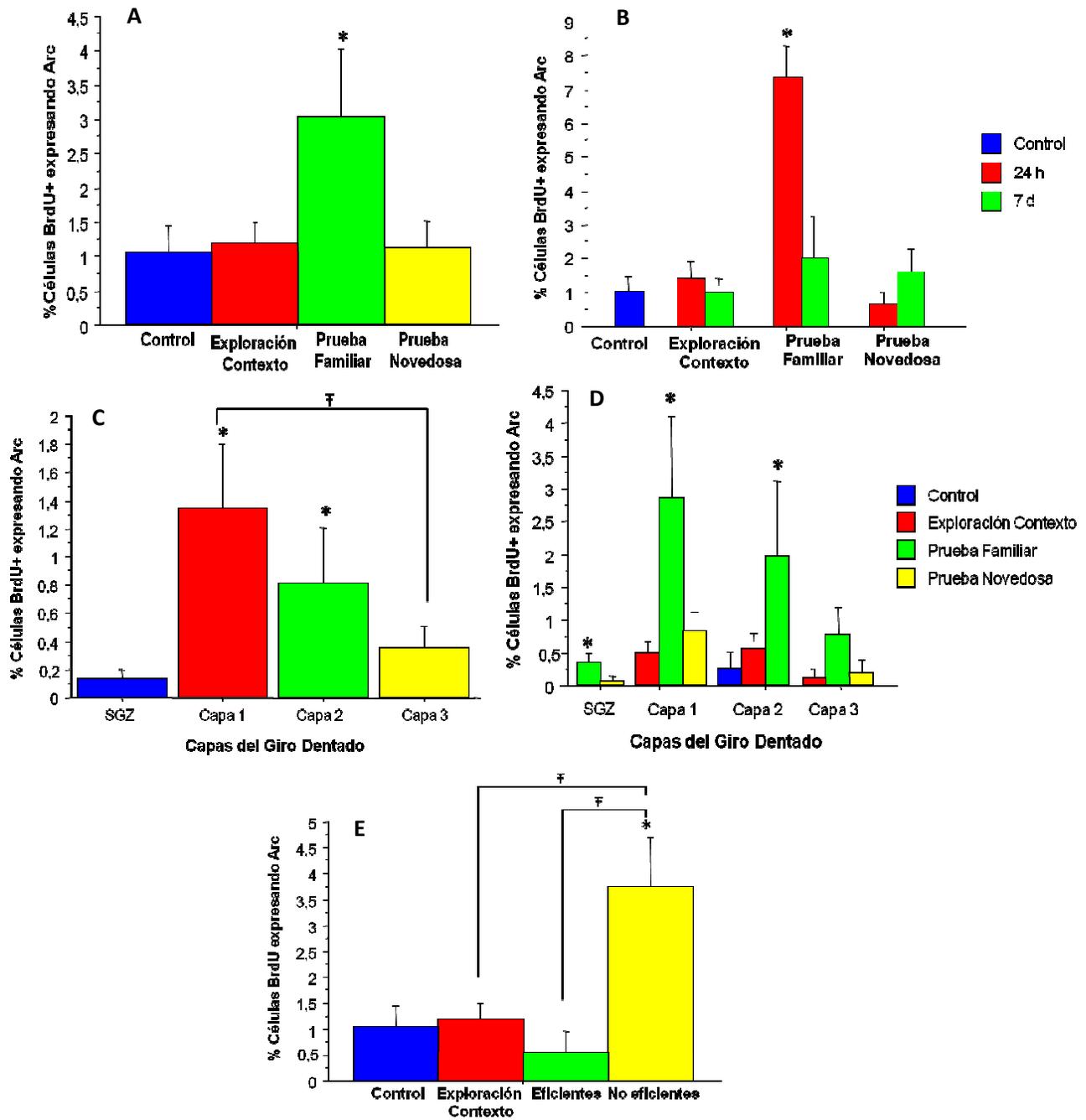
**Figura 37.** Nuevas células granulares en el GD. **A.** Se muestra el porcentaje de las células granulares BrdU (+) en la banda superior y en la banda inferior del GD en animales controles, con exploración de contexto y aquellos que ejecutaron la prueba de retención con objeto familiar y con objeto novedoso en la tarea de reconocimiento de objetos. **B.** Se observa el porcentaje de las células granulares BrdU (+) en la banda superior y en la banda inferior del GD en la evocación de una memoria reciente (24h) y remota (7d) (promedio de todos los grupos experimentales). **C.** Se muestra la distribución de las células BrdU+ a lo largo de la capa granular del GD (Promedio de todos los grupos experimentales). **D.** Se observa el efecto de la tarea de reconocimiento de objetos (TRO) en la distribución de las células BrdU+ a lo largo de la capa granular del GD (solo se tuvo en cuenta los animales controles y los que ejecutaron la TRO, promedio de la prueba de retención con objeto familiar y objeto novedoso). \*\* $p<0.0001$  con respecto al control (D), con respecto a la SGZ (C); \* $p<0.05$  con respecto al control (D), con respecto a la SGZ (C);  $F$   $p<0.05$  entre grupos.

Tampoco se encontró diferencia significativa en el porcentaje de células nuevas (*BrdU+*) en la sobrevivencia de estas células como producto de la tarea conductual de sujetos que ejecutaron la prueba a las 24 h y 7 d después de la prueba de retención en la banda superior (ANOVA,  $F_{(2,33)}=0.057$   $p=0.9449$ ) ni en la banda inferior (ANOVA,  $F_{(2,33)}=0.606$   $p=0.5515$ ), se encontró 0.55% de neuronas nuevas en el GD en promedio en la banda superior y 0.68% aproximadamente en la banda inferior del GD (Fig. 37).

Las nuevas células granulares de 45 días de edad se distribuyen a lo largo de la capa granular del GD; el 41,5% de las nuevas neuronas se ubican en la zona subgranular, el 38% en la capa 1, el 10% en la capa 2 y el 25.5% en la capa 3 de la capa granular. Se encontraron diferencias significativas (ANOVA,  $F_{(35)}=1992,132$   $p<0.0001$ ) en la disminución del porcentaje de nuevas células granulares en la capa 2 ( $p<0.0001$ ) y capa 3 ( $p<0.0001$ ) con respecto a las que se quedan en la SGZ, el decremento de la distribución de estas células en la capa 3 ( $p<0.0001$ ) con respecto a la capa 1 también es significativo, de igual forma el decremento en la capa 2 ( $p<0.0001$ ) con respecto a la capa 3 (Fig. 37).

Sin embargo, esta distribución celular en el GD puede cambiar significativamente (ANOVA,  $F_{(35)}=2412,079$   $p<0.0001$ ) en aquellos sujetos a los cuales se les expuso a la tarea de reconocimiento de objetos en la capa 1 y en la capa 3 del GD; en la capa 1 ( $p<0.0001$ ) el porcentaje de células granulares *BrdU+* disminuyó de un 49% a un 38%, en cambio en la capa 3 ( $p<0.0001$ ) el porcentaje de células *BrdU+* aumentó de un 16% a un 28.5% aproximadamente (Fig. 37).

**Células granulares *BrdU/NeuN* positivas que expresan la proteína de *Arc*.** En el GD hay diferencias significativas (ANOVA,  $F_{(3,32)}=5,718$   $p=0.047$ ) en el porcentaje de nuevas células granulares (*NeuN/BrdU+*) que expresan la proteína *Arc*, en la prueba de retención de la tarea de reconocimiento de objetos con objeto familiar con respecto al control ( $p<0.05$ ); se encontró que el 3.1% de las células *NeuN/BrdU+/Arc+* se activan en la presentación de objeto familiar en la prueba de retención, el 1.3% para la prueba memoria con objeto novedoso, el 1.4% para la exploración del contexto sin objetos y 1% en control intacto (Fig. 38).



**Figura 38.** Nuevas neuronas granulares en GD expresando la proteína *Arc*. **A.** Se observa el porcentaje de nuevas células granulares expresando la proteína *Arc* en animales controles, con exploración de contexto y aquellos que ejecutaron la prueba de retención con objeto familiar y objeto novedoso en la TRO (promedio 24 h y 7 d). **B.** Se muestra el porcentaje de nuevas neuronas granulares que expresan la proteína *Arc* en animales controles, con exploración de contexto y aquellos que ejecutaron la prueba de retención con objeto familiar y objeto novedoso en la ejecución de la tarea de reconocimiento de objetos en una memoria reciente (24 h) y memoria remota (7 d). **C.** Se muestra la distribución de las células granulares *NeuN/BrdU+* que expresan la proteína *Arc* en las cuatro capas del GD (promedio de todos los grupos). **D.** Se observa la distribución de las células granulares *NeuN/BrdU+* que expresan la proteína *Arc* en cada una de las conductas realizadas por el animal (exploración de contexto, prueba de retención con objeto familiar y con objeto novedoso y control intacto) en las diferentes capas del GD. **E.** Se observa la expresión de la proteína de *Arc* en las células granulares *BrdU+* en animales controles, con exploración de contexto y aquellos que ejecutaron de manera eficiente y no eficiente la tarea de reconocimiento de objetos. \*  $p < 0.05$  con respecto al control;  $\text{F}$   $p < 0.05$  entre grupos.

El 7.4% de las nuevas células granulares en el GD expresan la proteína *Arc* en la evocación de una memoria reciente (24 h) con objeto familiar de manera significativa (ANOVA,  $F_{(3,32)}=8,874$   $p=0.0138$ ) en comparación con el 2% de las nuevas células granulares que expresan *Arc* en una prueba de memoria remota (7 d) con el mismo objeto novedoso ( $p<0.05$ ).

En la prueba de retención de memoria con objeto novedoso reciente la proteína expresa *Arc* en 0.5% de las células y en memoria remota el 1.5%. En la exploración de contexto solo el 1.2% de las nuevas células granulares expresan la proteína *Arc* y en el grupo control intacto es el 1% (Fig. 38).

Las nuevas neuronas granulares que expresan la proteína *Arc* también se distribuyen a lo largo de la capa granular del GD de forma significativa (ANOVA,  $F_{(35)}=4,891$   $p<0.0001$ ), en la capa SGZ el 0.15% de las células granulares *BrdU+/Arc+* ( $p<0.0001$ ), el 1.35% en la capa 1 ( $p<0.0001$ ), el 0.8% en la capa 2 ( $p<0.0001$ ) y el 0.35% en la capa 3; se encontró diferencia significativa en la capa 1 y capa 3 ( $p<0.05$ ) (Fig. 38).

Sin embargo, esta distribución celular en el GD puede darse diferencialmente por conductas que el sujeto experimental ha ejecutado (ANOVA,  $F_{(3,32)}=9.033$   $p=0.041$ ), en aquellos sujetos a los cuáles se les expuso a la tarea de reconocimiento de objetos con prueba de retención con objeto familiar en la capa SGZ, capa 1 y en la capa 2 del GD; en la capa SGZ ( $p<0.05$ ) el porcentaje de células granulares *NeuN/BrdU+/Arc+* es de 0.4%, 2.6% en la capa 1 ( $p<0.05$ ), 2% en la capa 2 ( $p<0.05$ ) y de 0.75% en la capa 3. Siendo mayor que el porcentaje de nuevas células que expresan la proteína *Arc* en sujetos que ejecutaron una prueba de memoria con objeto novedoso o en aquellos que exploraron el contexto (Fig. 38).

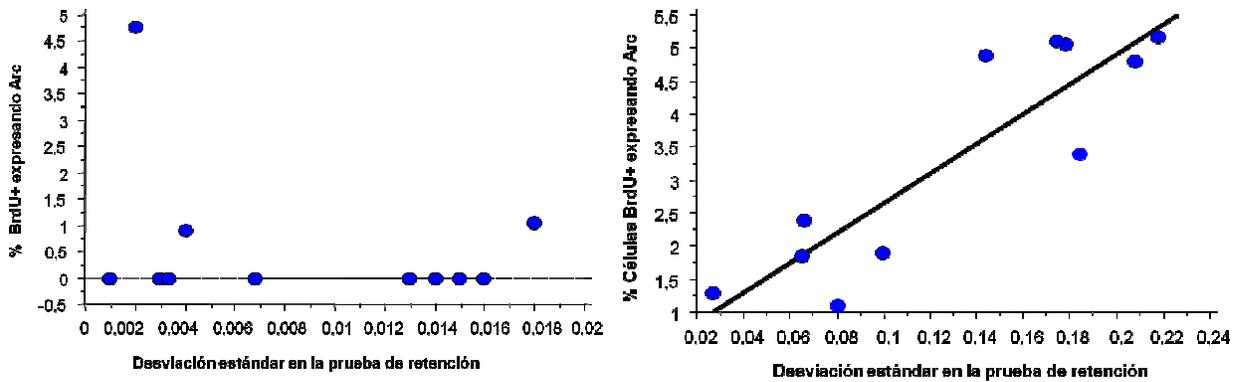
En los animales que ejecutaron incorrectamente la tarea de reconocimiento de objetos se encontró diferencias significativas (ANOVA,  $F_{(3,32)}=4.909$   $p=0.0064$ ) en el porcentaje de nuevas células granulares que expresan *Arc* con respecto a aquellos sujetos que ejecutan de forma correcta la tarea conductual ( $p<0.05$ ) y con aquellos animales que exploraron el contexto ( $p<0.05$ ). El 3.8% de las células *NeuN/BrdU+* expresan la proteína *Arc* en sujetos experimentales eficientes, el 0.6%

en aquellos sujetos no eficientes, el 1.25% en los animales que exploraron el contexto sin objetos y el 1.1% en los controles intactos (Fig. 38).

**Correlación entre el número de células granulares NeuN/BrdU+/Arc+ y la eficiencia en la ejecución de la tarea de reconocimiento de objetos.** La eficiencia de los animales en la ejecución de la TRO se observó con respecto a la variabilidad en la exploración de los objetos familiares en cada una de las pruebas de retención ejecutadas (desviación estándar); es decir, un animal que tiende a tener preferencia por un objeto familiar en lugar de un objeto novedoso (prueba de objeto novedoso) tiende a tener una mayor desviación estándar; en aquellos animales que tienen preferencia por un objeto familiar (prueba con objeto familiar) también presenta una mayor desviación estándar, a estos animales se les denominó animales “no eficientes”.

Si los animales en la prueba de retención con objeto familiar no tienen preferencia por ningún objeto en particular, es decir, los explora en igual proporción de tiempo la desviación estándar es menor; en el caso de la prueba de memoria con objeto novedoso, el animal prefiere explorar el objeto nuevo, explora en igual proporción los objetos familiares también ha de tener una baja desviación estándar, a estos animales se les denominó “eficientes” en la ejecución de la TRO.

Se encontró una relación directamente proporcional (regresión lineal simple;  $R^2=0.784$ ,  $F_{(1,10)}=32.586$ ,  $p=0.0003$ ) en el porcentaje de nuevas neuronas granulares que expresan la proteína *Arc* y el grado de ineficiencia que tuvieron los sujetos experimentales en el momento de ejecutar la tarea de reconocimiento de objetos, organismos con una desviación estándar (variabilidad en la exploración de los objetos) de 0.215 expresa la proteína *Arc* en el 5% de las nuevas células granulares. No se encontró una relación entre (regresión lineal simple;  $R^2=0.083$ ,  $F_{(1,10)}=0.811$ ,  $p=0.3914$ ) el porcentaje de nuevas células granulares que expresan la proteína *Arc* y el grado de eficiencia en la ejecución de la TRO (Fig. 39).



**Figura 39.** Regresión lineal simple entre el porcentaje de células granulares *NeuN/BrdU+* que expresan la proteína *Arc* y la eficiencia (desviación estándar, cuya medida refleja la conducta de exploración de cada uno de los objetos) de los sujetos experimentales en la tarea de reconocimiento de objetos. A la izquierda, animales eficientes. A la derecha animales no eficientes. ( $R^2=0.784$ ,  $p<0.001$ ).

Hay una correlación inversamente proporcional (coef. correlación=0.885,  $p<0.0001$ ) en el porcentaje de nuevas neuronas granulares que responden a la tarea de manera no eficiente, es decir, a medida que aumenta la ineficiencia del sujeto experimental en la ejecución de la tarea de reconocimiento de objetos se encuentran un mayor porcentaje de células *NeuN/BrdU+/Arc+*. No se observó correlación (coef. correlación= -0.287,  $p=0.4028$ ) entre el número de nuevas células granulares que expresan *Arc* y los animales que ejecutaron de manera eficiente la tarea conductual.

## DISCUSIÓN

Las principales contribuciones del trabajo que aquí se presenta son: i) la estandarización de una tarea de reconocimiento de objetos con 3 ítems a discriminar que cambian de posición en cada sesión de adquisición, cuya memoria se puede evocar hasta 7 días después de la última sesión de entrenamiento. ii) la evaluación de diferentes procedimientos de administración de *BrdU* para identificar las nuevas células granulares que nacen en el giro dentado de la rata adulta. iii) se identificaron unidades neuronales que expresan la proteína *Arc* en respuesta al procesamiento de información de la tarea de reconocimiento de objetos en una prueba de evocación con objeto familiar o novedoso en una memoria remota o reciente. iv) se encontró que las nuevas células granulares que nacen en el animal adulto modifican su distribución en las diferentes láminas de la capa de células granulares del GD en respuesta a la experiencia de la TRO. v) se observó la participación de las nuevas células granulares del giro dentado en el procesamiento de información de la tarea de reconocimiento de objetos tanto en animales eficientes como no eficientes, en la evocación de una memoria reciente y remota, con objeto familiar y novedoso.

**Tarea de reconocimiento de objetos.** La TRO es una conducta que no requiere ningún tipo de reforzador por ello se considera que este tipo paradigma conductual produce una memoria lábil en los animales que la ejecutan. Se ha visto que una sesión de entrenamiento con 2 objetos puede almacenarse por 2 horas (Ennaceur et al., 1989) pero no por un periodo superior a 2 horas después de la última sesión de adquisición (Ennaceur et al., 1989); sin embargo, en trabajos un poco más recientes se ha recuperado información de esta tarea hasta por un periodo de 24 horas (Balderas et al., 2008). No obstante, nosotros estandarizamos esta tarea en la cual se hizo un sobreentrenamiento de 5 días con un ensayo por día (sesiones de familiarización) con 3 objetos a discriminar cuya memoria se pudo evocar a las 24 horas y 7 días después de la última sesión de entrenamiento, en la cual el almacenamiento de esta información fue duradero y estable hasta por 7 días pues no se encontró diferencias en las pruebas de retención ejecutadas en ambos puntos temporales. Otro aspecto que también se tuvo en cuenta para estandarizar este paradigma fue la habituación al contexto en el cual se iba a llevar a cabo el entrenamiento y la prueba de memoria durante 5 días, se ha visto que ratas que han sido expuestas a repetidas exposiciones al ambiente

prefieren el objeto novedoso en la prueba de retención, además conductas como locomoción, estrés y neofobia se ven disminuidas (Balderas et al., 2008).

Se ha visto que durante las primeras sesiones de exposición a la TRO (adquisición) la rata se habitúa a las características del estímulo (objetos), el test de objeto novedoso es considerado como test de habituación porque la preferencia por el objeto novedoso se indica como un decremento en la respuesta a medida que aumenta el número de ensayos ante el objeto familiar y un incremento en la respuesta del objeto novedoso (deshabitación) (Besheer J y Bevins R, 2000); en este caso, en el cual la adquisición de la TRO fue de 5 sesiones se observó dicho decremento de la respuesta desde la primera sesión de adquisición, sin embargo, el decremento significativo en el tiempo de exploración a los objetos se observó a partir de la tercera sesión de entrenamiento, por lo cual se podría inferir que el paso de la memoria lábil de una sesión de entrenamiento a una memoria duradera y estable se observa a partir de la tercera sesión de adquisición.

Como es bien sabido, en la mayoría de las tareas conductuales hay animales que ejecutan de manera eficiente y no eficiente dicho paradigma, en este trabajo nos interesaron ambos casos pues quisimos observar la dinámica en la activación de las células granulares *NeuN/BrdU+* y *NeuN/BrdU-* (las cuales fueron marcadas con el método establecido en este mismo trabajo) en el GD expresando la proteína *Arc*. Como parámetro de la selección de los animales se utilizó la variabilidad (desviación estándar) en el índice de exploración para cada uno de los objetos presentados en cada una de las 5 sesiones de adquisición y en las 3 sesiones de prueba de retención en la TRO para cada uno de los sujetos experimentales.

**Marcaje de nuevas células granulares en el GD.** El *BrdU* es un análogo a la timidina, el cual se utilizó en esta investigación con el fin de marcar las células granulares que han pasado por un proceso de división celular, sin embargo, estos marcadores tienen tendencias a marcar de manera diferencial el número de células dependiendo de la dosis utilizada, por ello fue necesario estandarizar la dosis adecuada para marcar una gran población de nuevas células granulares en el GD; en el caso del *BrdU* se ha reportado (Cameron et al., 2001) que las dosis superiores a 300 mg/kg en administración única, o periodos inferiores a 3 días provocan saturación del fármaco en el sistema y en la mayoría de los casos se observa toxicidad, pero, en nuestro trabajo

encontramos que dentro de las dosis óptimas (200mg/kg) se puede obtener un efecto tóxico para el organismo, como es el caso de la concentración de 200mg/Kg por 15 días, esto se debe a la intensidad del tratamiento, es decir, el tiempo en el cual los sujetos experimentales son inyectados. En la mayoría de los casos una dosis de 200 mg/Kg con intervalos de 1 día durante 15 días marca un número similar de nuevas neuronas que un tratamiento de 100 mg/Kg durante 7días. También se puede observar saturación del sistema usando la concentración de 200 mg/Kg durante 15 días, esto se vio en un decremento del porcentaje de células *BrdU*<sup>+</sup>. La dosis óptima para obtener una población de nuevas células granulares grande sin afectar la vida del sujeto experimental fue de 200mg/kg durante 7 días. Con este último tratamiento se obtuvo el 0,55% de las células granulares marcadas con *BrdU* en la banda superior y el 0,68% de células granulares *BrdU* en la banda inferior del GD; en otro trabajo reciente que desarrollamos en el laboratorio (Sandoval et al., 2011) donde se utilizó una dosis de 200 mg/Kg en 4 administraciones en un solo día se reportó el 0,15% de las células granulares marcadas con *BrdU* en la banda superior del GD, cuyo porcentaje de células fue evaluado 45 días después de la última administración de *BrdU* en ambos trabajos, tiempo en el cual se ha demostrado que las nuevas neuronas granulares se han integrado a la red hipocampal y han pasado por su periodo crítico.

**Distribución de las células NeuN/*BrdU* positivas en las capas del GD.** Estas nuevas neuronas granulares se distribuyen desde la zona subgranular del GD (lugar donde proliferan) hacia la capa 1, capa 2, y capa 3 (Fig. 21); siendo la capa 1 la más interna y la capa 3 la más externa; se ha reportado que en experimentos donde se ha colocado a los animales en exploración de campo abierto forzada se han distribuido el 12% de nuevas células granulares en la SGZ, el 51% en la capa 1, el 23% en la capa 2 y el 13% en la capa 3 (Sandoval et al., 2011). Sin embargo, en sujetos experimentales que ejecutaron la TRO esta distribución varía, encontramos el 41.5% de las nuevas células granulares en la SGZ, el 38% en la capa 1, el 10% en la capa 2 y el 25% en la capa 3. Esto puede deberse a que las nuevas neuronas granulares se pueden ir ubicando en cada una de las capas de la capa granular del GD dependiendo del procesamiento de información que se esté llevando a cabo, por ejemplo, se observó un efecto de la TRO en la distribución de las células en la capa 1 disminuyó un 10%, pero en la capa 3 la conducta promovió que más células llegaran a

esta capa, este incremento fue del 14%, estos datos fueron considerados con respecto al control intacto.

**Participación de las células granulares (NeuN+) del GD en el procesamiento de la información de la tarea de reconocimiento de objetos.** Desde que la TRO fue utilizada por primera vez para estudiar la memoria (Ennaceur et al., 1988) se inicio la controversia sobre las estructuras neuronales implicadas en el procesamiento de este tipo de información. Hay evidencias con estudios de lesiones que demuestran que la corteza perirrinal y la región de CA1 en el hipocampo son importantes para el procesamiento de información del objeto novedoso (Winters et al., 2005, Brown et al., 2001, Wan et al., 1999, Winters et al., 2008). Otros trabajos muestran que la contribución del hipocampo (en especial el GD) en el procesamiento de este tipo de información tiene que ver con la ubicación de los estímulos con respecto al contexto (Mumby et al., 2005), además de la familiaridad del estímulo (Wan et al., 1999, Brown et al., 2001, Mumby et al., 2005, Winters et al., 2008); así como estos trabajos se pueden encontrar otros en donde las lesiones de estas estructuras indican que estas estructuras no son indispensables para la ejecución de la tarea de TRO. En este trabajo encontramos que en el GD hay células granulares que participan en el procesamiento de información asociada a la TRO, dado que encontramos células que expresan la proteína *Arc* en respuesta a esta tarea. Un hallazgo importante es que existen patrones neuroanatómicos de actividad neuronal, medidos mediante la detección de la expresión de la proteína *Arc*, característicos de la tarea de reconocimiento de objetos. Esto debido a que se observa un número de unidades neuronales activas (1.8%) en la lamina superior (lamina 3) significativamente mayor al número de unidades activas (~1.2%) en las laminas medial e inferior del GD. Además se encontró una respuesta significativa de las células granulares de la banda inferior del GD ante la TRO, lo cual es diferente de lo que se ha observado en otros trabajos (Chawla et al., 2005); esta activación coincide con la noción del código escaso para el procesamiento de información espacial, que ahora se ha observado en una TRO.

Se ha reportado que experiencias espaciales inducen la expresión de la proteína *Arc* en 1.3% de las neuronas granulares y en condiciones de control intacto solo el 0.5% de las células granulares del GD muestran expresión de *Arc* (Chawla et al., 2005). Esto es consistente con estudios electrofisiológicos (Leutgeb et al., 2007). En otros trabajos en los cuales se somete a los animales a exploración de campo abierto forzado se ha observado que entre el 1.5 y el 1.75% de las células

granulares expresan la proteína *Arc* (Chawla et al., 2005; Rosi et al., 2005, Ramírez-Amaya et al., 2006, Sandoval et al., 2011) respectivamente; sin embargo, en este trabajo encontramos que en animales controles intactos se activan el 1%, en exploración de campo abierto el 1.7%, en la prueba de retención con objeto novedoso el 1.85% y con objeto familiar el 2.1% de las células granulares del GD; estos valores cambiaron un poco con respecto a lo reportado, pues en la condición control intacto los animales fueron transportados al cuarto donde se llevó a cabo la TRO, es posible que en ese cuarto las ratas pudieron activar células asociadas al nuevo contexto. También varía el porcentaje de células granulares que se activan en el GD durante la exploración del contexto en donde se lleva a cabo la TRO pero sin objetos en comparación con lo reportado en la literatura en la exploración de campo abierto forzado, pues la exploración que ejecutaron las ratas en este paradigma conductual fue de forma libre en el espacio de la caja, también esta exploración fue habituada al contexto (5 días) cuya experiencia se convirtió en algo familiar para el sujeto. No obstante, hay trabajos en los cuales se han hecho análisis semicuantitativo RT-PCR de los niveles de ARNm de *Arc* en GD microdisectados de animales que exploran libremente un campo abierto con arena familiarizado por 3 días y no encontraron una expresión diferencial con respecto a animales controles intactos (Soulé et al., 2008), es probable que la ausencia de resultados diferenciales se pueda deber al tipo de técnica utilizada, en la cual pudo haber un error de manipulación en el momento de microdisectar el GD.

En la banda superior del GD se encontró que el 2.2% de las células granulares expresan la proteína de *Arc* en respuesta de la prueba de retención con objeto familiar y el 1.8% con objeto novedoso esto puede explicarse con un antecedente en el cual se observó la expresión del GEIT *c-Fos* en el cual se observa una alta activación en las células granulares en respuesta a arreglos familiares de los estímulos expuestos al sujeto experimental fenómeno que no ocurre ante arreglos de los ítems novedosos (Wan et al., 1999), estos resultados sugieren que no es el hipocampo el que está involucrado en el procesamiento de la información asociada a la novedad, lo cual se le atribuye ampliamente a la corteza perirrinal. En la banda inferior del GD esto no se observa lo cual puede explicarse con las diferencias de conectividad que tiene esta subestructura del hipocampo y es posible que pueda procesar otro tipo de información.

En la ejecución de la TRO encontramos que las células granulares del GD responden expresando la proteína *Arc* en mayor proporción en la evocación de una memoria remota (7 d) con objeto

familiar y novedoso, sin embargo, en la tarea netamente espacial como es el caso de la exploración de campo abierto estas neuronas granulares se activan en mayor proporción a las 24 horas después de la última sesión de exploración. Esta diferencia en la activación neuronal puede deberse a los componentes diferenciales de la tarea, pues hay un componente de reconocimiento en la TRO y en la exploración del contexto es espacial. En un trabajo realizado por Maviel y colaboradores (2004) en la ejecución de una tarea específicamente espacial como lo es el laberinto radial de 5 brazos se observó una mayor activación de Zif268 y c-Fos en las células granulares en el hipocampo dorsal y ventral ante la evocación de información espacial reciente (24 h), con respecto a la memoria remota (30 d).

Las células granulares del GD se activan expresando la proteína *Arc* de forma diferencial en las diferentes capas del GD, en la TRO encontramos el 7.5% en la SGZ, el 27.5% en la capa 1, el 27% en la capa 2 y el 37.5% en la capa 3. En la literatura se ha reportado que en sujetos experimentales que exploran diferentes ambientes la distribución de las neuronas granulares activadas es diferente, en la capa 1 (0.00007 células/área pixeles) y capa 2 (0.00008 células/área pixeles), siendo significativamente menor las que se encuentran en la capa 3 (0.000045 células/área pixeles), no encontraron neuronas que expresan *Arc* en la SGZ. (Chawla et al., en preparación). En un trabajo un poco más reciente encontramos que en los animales que exploran un campo abierto de manera forzada la distribución de estas células activas varían siendo 0.7% capa 1, 0.73% capa 2, 0.3% en capa 3, tampoco encontraron neuronas granulares expresando *Arc* en la SGZ (Sandoval et al., 2011). Todos estos datos nos hacen pensar que existe la posibilidad de que el procesamiento de información en el GD se hace por medio de una segregación de la información entre las tres capas identificadas dependiendo de la tarea conductual o de la experiencia del sujeto experimental. En el caso de la TRO se encontraron células activadas en la SGZ y mayor proporción en la capa 3, esto es muy diferente de lo que se ha reportado en la literatura por Sandoval y colaboradores (2011) ya que la tarea no es espacial sino que tiene el componente de reconocimiento. No encontramos ninguna relación en el porcentaje de células granulares que expresan la proteína *Arc* en animales que ejecutaron la TRO de manera eficiente o no eficiente y animales que exploraron el contexto de manera libre sin objetos.

**Participación de las nuevas células granulares del GD que proliferan en el animal adulto en el procesamiento de la información de la tarea de reconocimiento de objetos.** Se conoce

desde hace 46 años que en el cerebro del animal adulto se producen nuevas células granulares (Altman et al., 1965) en la SGZ del GD en el hipocampo, lo que ha sido muy complejo es determinar que funciones cumplen estas nuevas neuronas en el procesamiento de información. En este trabajo hemos encontrado que hay un porcentaje diferencial de nuevas neuronas granulares que expresan la proteína *Arc* siendo mayor en la banda superior que en la banda inferior del GD. El 1% de estas neuronas nuevas en la banda superior se activan en sujetos controles, el 1.1% en animales que exploraron el contexto libremente, el 3.1% en la ejecución de una prueba de TRO con objeto familiar y el 1.15% con objeto novedoso. Lo cual coincide con la dinámica de activación de las células granulares *BrdU* negativas. Se ha reportado en animales que exploran un campo abierto forzosamente el 0.48% expresan la proteína *Arc* (Sandoval et al., 2011). Esto nos muestra que las nuevas neuronas están participando en el procesamiento de información de reconocimiento de objetos en mayor proporción comparado con la exploración espacial.

Las nuevas neuronas granulares también se activan a lo largo de las diferentes capas del GD, se encontró que el 0.15% de las células granulares *BrdU*+ que expresan la proteína *Arc* en la SGZ, el 1.35% en la capa 1, 0.8% en la capa 2 y 0.35% en la capa 3; sin embargo, la TRO tiene un efecto claro en la distribución de las nuevas células activadas en el GD, la mayoría de nuevas neuronas granulares se activan en todas las capas ante la prueba de retención con objeto familiar, si bien es cierto en la SGZ las nuevas células granulares solo responden a la prueba de memoria de la TRO con objeto familiar y novedoso, esto nos puede indicar que esta activación en la SGZ es exclusiva para la TRO ya que no se ha observado esta activación en tareas espaciales (Sandoval et al., 2011). En la capa 2 del GD no se encontraron células que se activan específicamente a la prueba de retención con objeto novedoso sino a la exploración al contexto; es podría sugerir que las conexiones de la corteza perirrinal están llegando directamente a todas las capas del GD específicamente a la SGZ pero no a la capa 2 pues ahí no se observa procesamiento de información debido a la novedad del objeto, no obstante se requieren estudios específicos que puedan permitir la conclusión de esta hipótesis.

Las células que proliferan en el animal adulto en el GD responden en mayor proporción (0.74%) en la prueba de memoria reciente (24 h) de la TRO con objeto familiar, de igual forma, en la exploración del contexto libre hay tendencia a que estas nuevas neuronas respondan más a las 24 horas, sin embargo, en la prueba de retención de la TRO con objeto novedoso la mayor cantidad

de nuevas células granulares responden ante una memoria remota (7 d). Estos datos coinciden con el trabajo de Goodman y sus colaboradores (2010) en el cual se inhibió la neurogénesis con MAM (methylazoxymethanol acetate) y encuentran la falta de estas nuevas neuronas afectan la evocación de memorias recientes (24 h) en una prueba espacial dependiente de hipocampo.

En aras de interpretar un poco más a fondo la funcionalidad de las nuevas neuronas granulares se analizó la activación de estas células BrdU+ en animales que ejecutaron de manera eficiente y no eficiente la TRO. Encontramos que el 3.75% de las células *BrdU+* expresan la proteína *Arc* en animales no eficientes, el 0,5% en animales eficientes, el 1.15 en aquellos que exploraron el contexto y el 1% en aquellos que son control intacto. Estos datos contra intuitivos muestran una correlación inversamente proporcional (Coef. Correlación=0.885,  $p < 0.0001$ ), es decir, a mayor número de células nuevas activadas es menor la eficiencia de los sujetos experimentales para ejecutar la TRO. Este hallazgo puede interpretarse con el aporte de Aimone y colaboradores (2006), en donde dicen que –“la inclusión de nuevas células granulares en el GD pueden tener un efecto opuesto a la separación de dos eventos”-, cuya funcionalidad es preponderante en el GD. Si las nuevas neuronas son las que mayor probabilidad de disparar que las neuronas granulares maduras son las que tienden a responder a un estímulo entrante, sin embargo neuronas que han nacido en un periodo más corto tienen a responder a un segundo estímulo con mayor probabilidad, esto implica que habrá un solapamiento en la codificación en CA3 formando un patrón, pero como son estas nuevas células más responsivas ante otros eventos van a solaparse más estímulos entrantes en CA3 y esto conllevaría a que la función de separador de patrones ya no sería tan eficiente. Este tipo de análisis conllevan a pensar que este efecto es transitorio, ya que se ha visto que a medida que las nuevas neuronas maduran se especializan hasta llegar al grado de las neuronas maduras, quienes separan patrones de forma adecuada, es por esto que animales que son no eficientes en la TRO, que no son capaces de discriminar ante los objetos y de reconocer la novedad y la familiaridad son los que más células granulares nuevas activan expresando la proteína *Arc*.

Lo que si queda claro es que si bien el hipocampo o principalmente el GD no son estructuras centrales en el procesamiento de información de la TRO, si participan en dicho procesamiento, lo que demuestra una vez más que la información en el sistema nervioso se procesa en redes locales e integrales, además, de que la información es redundante.

## CONCLUSIONES

Los sujetos experimentales lograron aprender la tarea de reconocimiento de objetos utilizando 3 objetos a familiarizar en 5 sesiones de adquisición (una diaria). La información adquirida fue evocada tanto a las 24 horas como a los 7 días después de la última sesión de adquisición, observando que a partir de la tercera sesión de entrenamiento a la tarea conductual es donde se ve el decremento significativo en el tiempo de exploración de los objetos. La retención de esta información pudo ser recuperada de manera eficiente o no eficiente en los sujetos experimentales, lo cual fue usado como parámetro de clasificación para el análisis histológico.

Las células granulares del GD participan en el procesamiento de información de la TRO expresando la proteína *Arc*, lo cual implica que el procesamiento de información en el sistema nervioso no está presente en una sola estructura, sino que se da en redes locales e integrales reiterando que hay redundancia en el procesamiento de información en múltiples estructuras cerebrales.

La proporción de células que expresan la proteína *Arc* en las células granulares del GD fue más alta en la prueba de retención con objeto familiar, seguida de la exploración al contexto libre y la prueba de memoria con objeto novedoso. Hay una regionalización en la activación de las células granulares en las diferentes capas del GD, encontrándose activación en la SGZ y es su mayoría en la capa 3; lo cual implica que esta activación por regiones pueda darse de acuerdo al tipo de información que está procesando el GD.

La información que tiene el componente de reconocimiento de objetos puede ser evocado activando mayor proporción de células granulares en la prueba de retención de memoria reciente (24 h), lo cual no ocurre con la información espacial, como es el caso de la exploración libre del contexto, el cual involucra más neuronas granulares 7 días después de la última sesión de exploración.

Las células granulares nuevas (*NeuN/BrdU+*) se distribuyen a lo largo del GD, sin embargo, se encontró un efecto de la conducta (TRO) en esta distribución, es decir, las nuevas neuronas tienen

a desplazarse más hacia la capa 3 y a distribuirse en menor proporción a la capa 1 con respecto a los controles intactos que si se distribuyen en mayor proporción en la capa 1 y menor en la capa 3.

Las nuevas células granulares se activan expresando la proteína *Arc* en mayor proporción ante una prueba de retención de memoria reciente (24h) de la TRO con objeto familiar. También encontramos que hay activación de estas neuronas en la SGZ, aunque la mayoría en la capa 1 del GD; la activación en la SGZ es específica para componentes de novedad y familiaridad de los objetos de la TRO. En la capa 2 las células activas responden a la exploración espacial, lo cual nos aproxima a intuir que hay conexiones específicas a las diferentes regiones del GD que activan las nuevas neuronas de acuerdo al tipo de información del estímulo entrante.

Hay una correlación inversamente proporcional entre el número de nuevas células granulares activas y la eficiencia que tiene el animal para ejecutar la TRO. Esto infiere que el proceso neurogénico está creando *ruido* en la información que se está separando en el GD, esto se debe a la alta responsividad de estas nuevas neuronas ante la información entrante por lo menos en células que no se han especializado totalmente a los 45 días de su proliferación.

Se deben ejecutar trabajos de investigación que nos muestre más evidencias de la regionalización que hay en el procesamiento de información en el GD y la relación con la activación de otras estructuras, además, de algunos trabajos que aporten claridad en la respuesta de las nuevas células granulares en la eficiencia de los animales para ejecutar tareas conductuales en una etapa de maduración y especialización mayor.

## REFERENCIAS

Aimone JB, Wiles J y Gage FH. 2006. Potential role for adult neurogenesis in the encoding of time in new memories. *Nat Neurosci.* 9, 723-7.

Altman J. 1965. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol.* 137, 433-458

Alvarez-Buylla A, Theelen M y Nottebohm F. 1993. Mapping of radial glia and of a new cell type in adult canary brain. *J Neurosci.* 8, 2707-2712.

Amaral D y Scharman H. 2007. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Brain Res.* 163, 3-21

Ambrogini P, Lattanzi D, Ciuffoli S, Agostini D, Bertini L, Stocchi V, Santi S y Cuppini R. 2004. Morpho-functional characterization of neuronal cells at different stages of maturation in granule cell layer of adult rat dentate gyrus. *Brain Res.* 1017, 21-31.

Baddeley A. 1988. Cognitive psychology and human memory. *Trends Neurosci.* 11, 176-181.

Balderas I, Rodriguez-Ortiz CJ, Salgado-Tonda P, Chavez-Hurtado J, McGaugh JL y Bermudez-Rattoni F. 2008. The consolidation of object and context recognition memory involve different regions of the temporal lobe. *Learn Mem.* 15, 618–624.

Barraquer-Bordas L. 1992. Sobre las diferentes capacidades involucradas en la memoria sobre las disociaciones condicionadas por síndromes amnésicos. *Arch Neurobiol.* 55, 57-67

Bear MF. 1994. Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr. Opin. Neurobiol.* 4, 389-399

Bello-Medina PC, Sandoval CJ y Ramírez-Amaya V. En preparación. Voluntary exercise accelerates the functional integration of new neurons in the hippocampal behavioral relevant networks.

Bevins R y Besheer J. 2006. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study “recognition memory”. *Nature protocols.* 1. 1306-1311.

Blackstad TW, Brink K, Hem J y Jeune B. 1970. Distribution of hippocampal mossy fibers in the rat. An experimental study with silver pre-impregnation methods. *J. Comp. Neurol.* 138, 433–450.

Bliss TV y Lomo T. 1970. Plasticity in a monosynaptic cortical pathway. *J Physiol.* 2, 61-69.

Bliss TV 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.

Brown MW y Aggleton JP. 2001. Recognition memory: what are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? *Nature reviews*. 2, 51-61.

Bussey TJ y Aggleton JP. 2002. The “what” and “where” of event memory: independence and interactivity within the medial temporal lobe. En Parker A, Wilding E, Bussey TJ (Eds.), *The Cognitive Neuroscience of Memory: Encoding and Retrieval*. (pp. 217–233), New York: Psychology Press.

Cameron HA y McKay RD. 2001. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 435, 406–417.

Chawla MK, Bello-Medina PC, Sandoval CJ, Ramírez-Amaya V y Barnes CA. (En preparación). Location of Arc mRNA expressing granule cells following spatial exploration in the rat dentate gyrus.

Chawla MK, Guzowski JF, Ramírez-Amaya V, Lipa P, Hoffman KL, Marriott LK, Worley PF, McNaughton BL y Barnes CA. 2005. Sparse, Environmentally Selective Expression of Arc mRNA in the Upper Blade of the Rodent Fascia Dentata by Brief Spatial Experience. *Hippocampus* 15, 579–586.

Chowdhury S, Shepherd JD, Okuno H, Lyford G, Petralia RS, Huganir RL y Worley PF. 2005. Arc interacts with endophilin to regulate AMPA receptor trafficking. *Nature* 26, 125-132.

Corotto FS, Henegar JA y Maruniak JA. 1993. Neurogenesis persists in the subependymal layer of the adult mouse brain. *Neurosci Lett.* 149, 111-114.

Crosson B. 1992. Subcortical neuroanatomy and memory. En Crosson B (Ed.), *Subcortical functions in language and memory*. (pp. 149–159), New York: The Guilford Press.

del Rio JA y Soriano E. 1989. Immunocytochemical detection of 5‘bromodeoxyuridine incorporation in the central nervous system of the mouse. *Brain Res Dev.* 49, 311-317.

Delis DC. 1989. Neuropsychological assessment of learning and memory. En Boller F, Cermak LS, Grafman J (Eds.), *Memory and its disorders: Handbook of Neuropsychology*. Vol.3 (pp. 7-33) Amsterdam: Elsevier Science.

Donai H, Sugiura H, Ara D, Yoshimura Y, Yamagata K y Yamauchi T. 2003. Interaction of Arc with CaM kinase II and stimulation of neurite extension by Arc in neuroblastoma cells expressing CaM kinase II. *Neurosci Res.* 47, 399-408.

Ennaceur A y Delacour J. 1988. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. *Behavioural Brain Research.* 31, 47-59.

Ergorul C y Eichenbaum H. 2004. The hippocampus and memory for "what," "where," and "when". *Learn Mem.* 11, 397-405.

Esposito MS, Piatti VC, Laplagne DA, Morgenstern NA, Ferrari CC, Pitossi FJ, Schinder AF. 2005. Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *J Neurosci.* 25, 10074-10086.

Farrant M y Nusser Z. 2005. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA<sub>A</sub> receptors. *Nat Rev Neurosci.* 6, 215-229

Forwood SE, Winters BD y Bussey TJ. 2005. Hippocampal lesions that abolish spatial maze performance spare object recognition memory at delays of up to 48 hours. *Hippocampus.* 15, 347-355.

Foster DJ, Wilson MA. 2006. Reverse replay of behavioural sequences in hippocampal place cells during the awake state. *Nature* 440:680-683.

Gage FH, Kempermann G, Palmer TD, Peterson DA y Ray J. 1998. Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus. *J Neurobiol.* 36, 249-66.

Ge S, Goh EL y Sailor KA 2006. GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons of the adult brain. *Nature.* 439, 589-593.

Ge S, Yang CH, Hsu KS y Ming GL. 2007. A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron* 54, 559-566.

Ge S, Sailor KA y Ming GL. 2008. Synaptic integration and plasticity of new neurons in the adult hippocampus. *J. Physiol.* 586, 3759-3765.

Goodman T, Trouche S, Massou I, Verret L, Zerwas M y Roulet P. 2010. Young hippocampal neurons are critical for recent and remote spatial memory in adult mice. *Neuroscience.* 171, 769-778.

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.

Hastings NB y Gould E. 1999. Rapid extension of axons into the CA3 region by adult generated granule cells. *J Comp Neurol.* 413,146-154.

Hebb DO. 1949. The first stage of perception: growth of the assembly. En Hebb DO (Ed.), *The organization of behavior; a neuropsychological theory.* (pp 60-78), New York: willey.

Hitch GJ. 1984. Working memory. *Psychological Medicine,* 14, 265-271.

Holscher C. 2003. Time, space and hippocampal functions. *Neurosci.* 14, 253-284.

Jessberger S, Clark RE, Broadbent NJ, Clemenson GD, Consiglio A, Lie DC, Squire LR y Gage FH. 2009. Dentate gyrus-specific knockdown of adult neurogenesis impairs spatial and object recognition memory in adult rats. *Learn Mem.* 16, 147-154.

Kandel, E., Schwartz, J. y Jessell, T. 2001. "Neurociencia y Conducta". Madrid: Prentice Hall.

Kaplan MS, McNelly NA y Hinds JW. 1977. Population dynamics of adult-formed granule neurons of the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol.* 239, 117-125.

Kee N, Teixeira CM, Wang AH y Frankland PW. 2007. Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus. *Nat. Neurosci.* 10, 355-362.

Kempermann G y Gage FH. 2002. Genetic determinants of adult hippocampal neurogenesis correlate with acquisition, but not probe trial performance, in the water maze task. *J. Neurosci.* 16, 129-136.

Kempermann G, Gast D, Kronenberg G, Yamaguchi M y Gage FH. 2003. Early determination and long term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development.* 130, 391-399.

Kempermann G, Jessberger S, Steiner B y Kronenberg G. 2004. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends in Neurosci.* 27, 447-52.

Laplagne DA, Esposito MS y Piatti VC. Morgenstern NA, Zhao C, van Praag H, Gage FH, Schinder AF. 2006. Functional convergence of neurons generated in the developing and adult hippocampus. *PLoS Biol.* 4, 409-418.

Leutgeb JK, Leutgeb S, Moser MB y Moser EI. 2007. Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus. *Science.* 315, 961-966.

Lorente de No, R. 1933 Studies on the structure of the cerebral cortex. I. The Area Entorhinalis. *J. Psychol. Neurol.* 45, 381-438.

Lyford GL, Yamagata K, Kaufmann WE, Barnes CA, Sanders LK, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Lanahan AA y Worley PF. 1995. Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron* 14, 433-45.

Lynch MA. 2004. Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev.* 84, 87-136.

Marr, D. 1976. Early processing of visual information. *Lond B Biol Sci.* 275, 483-519.

Maviel Q, Thibault A, Durkin C, Thomas P, Menzaghi F y Bontempi B. 2004. Sites of Neocortical Reorganization Critical for Remote Spatial Memory. *Science,* 305, 96-105.

- Mayes AR y Roberts N. 2001. Theories of episodic memory. *Lond B Biol Sci.* 356, 1395-408.
- McNaughton BL, Barnes CA, Meltzer J y 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.
- McNaughton BL, y Morris RG. 1987. Hippocampal synaptic enhancement and information storage within a distributed memory system. *Trends Neurosci.* 10, 408–415.
- Moser EI. 2004. Hippocampal place cells demand attention. *Neuron.* 42, 183-5.
- Mullen RJ, Buck CR y Smith AM. 1992. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development.* 116, 201-211.
- Mumby DG. 2001. Perspectives on object-recognition memory following hippocampal damage: lessons from studies in rats. *Behav. Brain Res.* 127, 159–181.
- Nacher J, Varea E y Blasco-Ibanez J. 2007. NMDA receptor antagonist treatment induces a long-lasting increase in the number of proliferating cells, PSA NCAM- immunoreactive granule neurons and radial glia in the adult rat dentate gyrus. *Eur J Neurosci.* 13, 512-520.
- 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.
- Oliveira A, Hawk J y Abel T. 2010. Post-training reversible inactivation of the hippocampus enhances novel object recognition memory. *Learn Mem.* 17, 155-160.
- Paxinos G y Watson CH. 1998. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* New York: Academic Press.
- 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.
- Ramírez-Amaya V, Gage FH, Worley PF y Barnes CA. 2006. Integration of new neurons into functional neural networks. *J Neurosci.* 26, 12237-12241.
- Ramon Y, Cajal S. 1893. Estructura del asta de Ammon y fascia dentate. *Ann Soc Esp Hist Nat* 22:53–114.
- Rial EM, Lee-Osbourne J, Worley PF, Malinow R y Cline HT. 2006. Increased expression of the immediate-early gene Arc/Arg3.1 reduces AMPA receptor-mediated synaptic transmission. *Neuron.* 52, 461-74.

- Rosi S, Ramirez-Amaya V, Vazdarjanova A, Worley PF, Barnes CA y Wenk GL. 2005. Neuroinflammation disrupts the pattern of behaviorally induced Arc expression in the Hippocampus. *J Neurosci.* 25:723-731.
- Sakurai Y. 1999. How do cell assemblies encode information in the brain?. *Neurosci Biobehav Rev.* 23, 785-796.
- Sandoval CJ, Martínez-Claros M, Bello-Medina PC, Pérez O y Ramírez-Amaya V. 2011. When are new hippocampal neurons, born in the adult brain, integrated into the network that processes spatial information? *PLoS one.* 6, 23-31.
- Schmidt-Hieber C, Jonas P y Bischofberger J. 2004. Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature.* 429, 184-187.
- Seri B, García-verdugo JM, McEwen BS y Alvarez-Buylla A. 2001. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci.* 21, 7153-7160.
- Shepherd JD, Rumbaugh G, Wu J, Chowdhury S, Plath N, Kuhl D, Huganir RL y Worley PF. 2006. Arc Regulates Synaptic Scaling of AMPA Receptors. *Neuron.* 52, 475-484.
- Shors TJ, Miesegaes G, Beylin A y Gould E. 2001. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of traces memories. *Nature.* 429, 372-376.
- Shors TJ, Townsend DA, Zhao M, Kozorovitskiy Y y Gould E. 2002. Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus.* 12, 578-84.
- Shors TJ. 2003. Can new neurons replace memories lost?. *Sci Aging Knowledge Environ.* 49, 35-43.
- Soulé J, Penke Z, Kanhema T, Alme M, Laroche S y Bramham J. 2008. Object-Place Recognition Learning Triggers Rapid Induction of Plasticity-Related Immediate Early Genes and Synaptic Proteins in the Rat Dentate Gyrus. *Neural Plasticity.* 1, 1-12.
- Squire LR y Zola-Morgan S. 1988. Memory: brain systems and behavior. *Trends Neurosci.* 11, 170-175.
- Stanfield BB y Trice JE. 1988. Evidence that granule cells generated in the dentate gyrus of adult rats extend axonal projections. *Exp Brain Res.* 72, 399-406.
- Steward O y Worley PF. 2001. Selective targeting of newly synthesized Arc mRNA to active synapses requires NMDA receptor activation. *Neuron.* 30, 237-240.
- Stupien G, Florian C y Roulet P. 2003. Involvement of the hippocampal CA3-region in acquisition and in memory consolidation of spatial but not in object information in mice. *Neurobiol Learn Mem.* 80, 32-41.

Tashiro A, Makino H y Gage FH. 2007. Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: a critical period during an immature stage. *J Neurosci.* 27, 3252-3259.

Thompson LT y Best PJ. 1990. Long-term stability of the place-field activity of single units recorded from the dorsal hippocampus of freely behaving rats. *Brain Research.* 509, 299-308.

Tolman EC. 1948. Cognitive maps in rats and men. *Psychol Rev* 55:189–208.

Treves A. 2008. What is the mammalian dentate gyrus good for?. *J Neurosci.* 10, 1016-1022.

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.

Treves A. y Rolls ET. 1994. Computational analysis of the role of the hippocampus in memory. *Hippocampus.* 4, 374–391.

Trouche S, Bontempi B, Roullet P y Rampon C. 2009. Recruitment of adult-generated neurons into functional hippocampal networks contributes to updating and strengthening of spatial memory. *Proc Natl Acad Sci USA.* 06, 5919-5924.

van Praag H. 1999. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *PNAS.* 96, 13427–13431.

van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD y Gage FH. 2002. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature.* 415, 1030-1034.

van Praag H, Shubert T, Zhao C y Gage FH. 2005. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci.* 25, 8680–8685.

Wan H, Aggleton JP y Brown MW. 1999. Different contributions of the hippocampus and perirhinal cortex to recognition memory. *J Neurosci.* 19, 1142-1148.

Weisz VI y Argibay PF. 2009. A putative role for neurogenesis in neuro-computational terms: inferences from a hippocampal model. *Cognition.* 112, 229-40.

Winters BD, Saksida LM y Bussey TJ. 2008. Object recognition memory: Neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. *Neurosci Biobehav Rev.* 32, 1055–1070.

Worley PF, Cole AJ y Murphy TH. 1990. Synaptic regulation of immediate-early genes in brain. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 55, 213-23.

Zhao C y Deng W. 2008. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell.* 132, 645-660.

Zola-Morgan S y Squire LR. 1993. Neuroanatomy of memory. *Ann Rev Neurosci,* 16, 547-563.

## ÍNDICE DE FIGURAS

Pág.

<b>Figura 1.</b> Ensamble, conexiones sinápticas y conexiones recurrentes.....	3
<b>Figura 2.</b> Diagrama del hipocampo de rata.....	4
<b>Figura 3.</b> Corte horizontal de hipocampo de ratón.....	5
<b>Figura 4.</b> Formación hipocampal y sus principales aferencias.....	6
<b>Figura 5.</b> LTP en el hipocampo.....	7
<b>Figura 6.</b> Mecanismos moleculares en el establecimiento y mantenimiento del LTP.....	9
<b>Figura 7.</b> Representación esquemática de una rata explorando un área circular con señales externas.....	10
<b>Figura 8.</b> Neurogénesis en la zona subgranular.....	15
<b>Figura 9.</b> Curva de sobrevivencia de las nuevas células granulares.....	15
<b>Figura 10.</b> Migración de las nuevas neuronas a través de la capa granular del giro dentado.....	16
<b>Figura 11.</b> Desarrollo de las nuevas células granulares generadas en el hipocampo adulto.....	17
<b>Figura 12.</b> Porcentaje de células Arc positivas del total de la población de células BrdU positivas en exploración de campo abierto forzada.....	20
<b>Figura 13.</b> Modelo computacional de la conectividad del hipocampo.....	21
<b>Figura 14.</b> Modelo computacional en condiciones fisiológicas en el procesamiento de información episódica con 3 grupos de sistemas.....	22
<b>Figura 15.</b> Inhibición de la neurogénesis en la rata adulta.....	24
<b>Figura 16.</b> Efecto de la lesión del hipocampo en la tarea de reconocimiento de objetos.....	27
<b>Figura 17.</b> Expresión de <i>c-Fos</i> en dos tipos de tarea de reconocimiento de objetos.....	28
<b>Figura 18.</b> Conectividad en el procesamiento de información en la tarea de reconocimiento de objetos.....	29
<b>Figura 19.</b> Proceso de elaboración del bloque.....	37
<b>Figura 20.</b> Montaje del bloque en el criostato.....	38
<b>Figura 21.</b> Análisis de imágenes de GD obtenidos en el microscopio Apotome.....	40
<b>Figura 22.</b> Diseño experimental.....	45
<b>Figura 23.</b> Promedio de las células granulares BrdU positivas en cada uno de los tratamientos.....	47
<b>Figura 24.</b> Índice de exploración para cada uno de los objetos utilizados durante la adquisición.....	48
<b>Figura 25.</b> Índice de exploración para cada uno de los objetos utilizados durante la prueba de retención de una memoria reciente y remota.....	48
<b>Figura 26.</b> Índice de exploración para cada uno de los objetos en cada una de las pruebas de retención de una memoria reciente y remota.....	49
<b>Figura 27.</b> Tiempo de exploración en segundos para cada uno de los objetos que fueron utilizados como familiares y novedosos en la adquisición y prueba de retención.....	50

<b>Figura 28.</b> Tiempo de exploración en segundos para cada uno de los objetos en diferente orden en el cual fueron expuestos a los sujetos experimentales.....	51
<b>Figura 29.</b> Curva de aprendizaje de la tarea de reconocimiento de objetos.....	52
<b>Figura 30.</b> Índice de exploración para cada uno de los objetos utilizados durante la adquisición de la tarea de reconocimiento de objetos.....	52
<b>Figura 31.</b> Índice de exploración para cada uno de los objetos utilizados durante las 3 pruebas de retención de una memoria reciente.....	53
<b>Figura 32.</b> Fase de adquisición de la tarea de reconocimiento de objetos para el grupo de 24 horas por animal.....	54
<b>Figura 33.</b> Fase de adquisición de la tarea de reconocimiento de objetos para el grupo de 7 días.....	55
<b>Figura 34.</b> Prueba de retención ejecutada 24 horas después de la última sesión de adquisición.....	56
<b>Figura 35.</b> Prueba de retención ejecutada 7 días después de la última sesión de adquisición.....	58
<b>Figura 36.</b> Expresión de la proteína <i>Arc</i> en las células granulares del GD en la tarea de reconocimiento de objetos.....	60
<b>Figura 37.</b> Las nuevas células granulares (BrdU+) del GD en la tarea de reconocimiento de objetos.....	62
<b>Figura 38.</b> Expresión de la proteína de <i>Arc</i> en las nuevas células granulares en la tarea de reconocimiento de objetos.....	64
<b>Figura 39.</b> Regresión lineal simple entre el porcentaje de células granulares BrdU+ que expresan la proteína <i>Arc</i> y la eficiencia (desviación estándar) de los sujetos experimentales en la tarea de reconocimiento de objetos.....	67

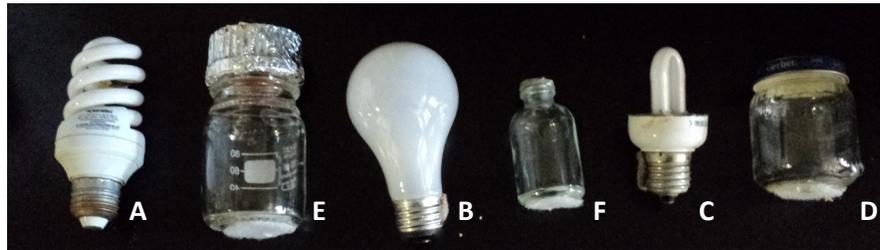
## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Combinaciones de objetos utilizadas en cada una de las sesiones de la fase de adquisición de la tarea de reconocimiento de objetos.....	35
<b>Tabla 2.</b> Combinaciones de objetos utilizadas en cada una de las sesiones de la prueba de retención de la tarea de reconocimiento de objetos.....	35
<b>Tabla 3.</b> Diseño experimental del Piloto 1, donde los sujetos experimentales se inyectaron con diferentes dosis y por diferentes periodos de tiempo.....	42
<b>Tabla 4.</b> Diseño experimental del experimento 2, en donde se hizo una prueba de retención a 24h (A), a los 7 días (B) con un grupo control (C) y su respectiva n.....	43
<b>Tabla 5.</b> Objeto prueba presentado por ensayo en cada uno de los 6 ensayos en los seis sujetos experimentales utilizados en este experimento.....	44
<b>Tabla 6.</b> Selección de sujetos experimentales para el análisis histológico.....	59

## APÉNDICE

### 1. Objetos utilizados en la tarea de reconocimiento de objetos.

Durante la adquisición y la prueba de retención de la tarea de reconocimiento se utilizaron los siguientes objetos:



Los cuales fueron agrupados en objetos familiares (A, B, C) y en objetos novedosos (D, E, F), los objetos familiares fueron expuestos al sujeto experimental durante las cinco sesiones de adquisición y los objetos novedosos fueron expuestos al animal durante las tres sesiones de la prueba de retención.

### 2. Coeficiente de Gundersen.

La estereología ofrece una serie de ventajas importantes para los estudios enmarcados dentro del campo científico, entre ellas destacan por ejemplo la reducción en el número de sujetos que forman parte de la muestra sobre los que se harán las estimaciones de interés. Numerosas investigaciones sobre la eficacia de dichos métodos han determinado que con una muestra de 4-6 sujetos en la mayoría de los casos se obtendrán unas estimaciones fiables (West y Gundersen, 1990; West, 1993). Se ha propuesto el cálculo de la variación debida al conteo de las neuronas dentro de una misma sección con el coeficiente de Gundersen (C.E).

$$C.E = \frac{\sqrt{3A + C - 4B/12}}{\sum P_i}$$

$P_i$  = Proporción de neuronas

$$A = \sum_{i=1}^m P_i^2 \quad B = \sum_{i=1}^{m-1} P_i \cdot P_{i+1} \quad C = \sum_{i=1}^{m-2} P_i \cdot P_{i+2}$$

Se ha considerado que índices que van de 0.5 a 1.0 presentan una alta variabilidad en el conteo y se considera el resultado como no confiable, lo cual sugiere que hay que aumentar el número de imágenes analizadas. Cuando el índice va de 0 a 0.49 se consideran datos confiables, a aquellos que fueron analizados como resultado del conteo celular.