



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS**  
**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

“SISTEMA INDUCIBLE PARA MARCADO DE NEURONAS ACTIVADAS DURANTE  
EL APRENDIZAJE DE UNA TAREA CONDUCTUAL”

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:  
LA LIC. DÁMARIS KETINÓ RANGEL GUERRERO

TUTORES PRINCIPALES:  
DR. VÍCTOR RAMÍREZ AMAYA (INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA)  
DRA. TERESA EDITH GARAY ROJAS (INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:  
DR. DANIEL REYES HARO (INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA)  
DR. JUAN RAFAEL RIESGO ESCOVAR (INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA)

CAMPUS JURIQUILLA, QUERÉTARO, AGOSTO, 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Universidad Nacional Autónoma de México  
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Comité Tutorial certificamos que la tesis elaborada por: Dámaris Ketinó Rangel Guerrero, cuyo título es: “SISTEMA INDUCIBLE PARA MARCADO DE NEURONAS ACTIVADAS DURANTE EL APRENDIZAJE DE UNA TAREA CONDUCTUAL”, se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma  
Presidente

---

Dr. Ataúlfo Martínez Torres  
Secretario (Tutor)

---

Dr. Víctor Ramírez Amaya  
Vocal

---

Dr. Osbaldo Resendis Antonio  
Suplente

---

Dr. Daniel Reyes Haro  
Suplente

---

Dr. Fernando Peña Ortega

Aprobado por el Comité Académico

---

Dra. María Teresa Morales Guzmán  
Coordinador del Programa

## **AGRADECIMIENTOS**

### **Institucionales:**

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca No: 371736 durante los 4 semestres de la Maestría en Neurobiología.

Agradezco a la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM Becario No. 407045402 y a la Coordinación de Posgrado del Instituto de Neurobiología.

Así mismo, quiero agradecer a la M. en C. Leonor Casanova por todo su apoyo y consejos en cuanto a los trámites y procedimientos académicos y administrativos; creo que todos quienes cursamos esta maestría le agradecemos además su interés en nuestro bienestar.

### **Directores de Tesis:**

Agradezco enormemente y con profundo afecto a mis directores de tesis: el Dr. Víctor Ramírez Amaya y la Dra. Teresa Edith Garay Rojas por su apoyo, guía y enseñanzas gracias a las cuales se ha desarrollado el proyecto.

Específicamente agradezco al Dr. Ramírez por haber confiado en mí para emprender este proyecto desde que me lo asignó tres años atrás como mi proyecto de tesis de licenciatura, así como por la motivación que me brindó en todo momento y también por su instrucción y ayuda en la realización de algunas técnicas utilizadas en el amplio espectro de este proyecto. También le agradezco al Dr. Ramírez su actitud abierta y su iniciativa de buscar apoyo para desarrollar aspectos del proyecto que distaban de las técnicas que se manejan en su laboratorio, lo que conllevó a las múltiples colaboraciones indispensables para la realización de este proyecto de tesis. De manera que después de tanto tiempo le expreso por este medio la grata emoción de que hayamos emprendido este proyecto juntos.

Por otra parte quiero expresar la enorme gratitud que guardo hacia la Dra. Garay, primeramente por haber aceptado tutorarme, y sobre todo por la dedicación que ha mostrado en la evaluación y realización de este proyecto, por el tiempo y esfuerzo invertidos en mi formación, y además por haberme transmitido durante toda mi maestría una constante actitud maternal en lo referente al aspecto académico, que me tranquilizó siempre. Creo adecuado puntualizar que al instruirme y ayudarme en todos los procedimientos de biología molecular con tanta paciencia y meticulosidad, la contribución de la Dra. Garay fue crucial para el

proyecto en cuestión. Es por ello que me siento sumamente afortunada por haber contado con el talento y habilidad que la caracterizan, y le estaré siempre profundamente agradecida.

### **Comité Tutelar:**

Agradezco a los integrantes de mi comité tutelar: el Dr. Daniel Reyes Haro y el Dr. Juan Rafael Riesgo Escovar, así como a mis tutores extraoficiales (el Dr. Hiroyuki Okuno y el Dr. Fernando Peña Ortega), tanto por el tiempo que dedicaron a la evaluación de este proyecto de tesis, como por sus valiosas observaciones y consejos.

### **Colaboradores:**

Quiero expresar mi gratitud a quienes permitieron establecer las colaboraciones esenciales para el desarrollo del proyecto; al Dr. Fernando Peña, el Dr. Ataulfo Martínez, el Dr. Rogelio Arellano, el Dr. Hiroyuki Okuno, el Dr. Haruhiko Bito, el Dr. Rafael Gutiérrez, el Dr. Osbaldo Resendis y el Dr. Federico Bermúdez.

Desde luego agradezco a la Dra. Anaid Antaramián por su colaboración y apoyo en la unidad de Proteogenómica, al MVZ. José Martín García Servín por su atento apoyo en el Bioterio, y a la Dra. Sofía Díaz por la revisión al formato del presente trabajo.

### **Miembros de los laboratorios colaboradores:**

Con cariño agradezco a quienes además de abrirme las puertas de sus laboratorios, me recibieron con trato amable, tuvieron la paciencia de instruirme en métodos nuevos para mí, y me brindaron apoyo y consejos en todo momento.

Hago mención especial a la M. en C. Edith Espino Saldaña por haber dedicado tanto tiempo en entrenarme para realizar las técnicas concernientes al cultivo celular de manera tan amistosa y por sus constantes consejos referentes a los procedimientos de biología molecular; a la M. en C. Adriana González Gallardo de la unidad de Proteogenómica por su amable y valiosa instrucción en las técnicas referentes a los procedimientos de biología molecular; así como al Dr. Benito Ordaz y al Lic. Abraham Márquez por haberme enseñado y ayudado de manera tan atenta a realizar todos los aspectos de los registros electrofisiológicos que se necesitaron en este proyecto. También agradezco a Reynaldo, Areli, Karla, Xavier, Arturo, Ernesto y Andrés por su ayuda eventual en dichos procedimientos. Y en general agradezco a

los miembros de los laboratorios C-01, D-13 y D-15 por su amabilidad.

Así mismo, agradezco al Lic. Franco Ortiz Caballero del laboratorio del Dr. Rafael Gutiérrez del CINVESTAV y a la Dra. Perla Moreno del laboratorio del Dr. Federico Bermúdez del IFC-UNAM, por su ayuda en la realización de los experimentos piloto que plantearon la base de la presente tesis.

**Compañeros de Laboratorio:**

Agradezco a mis compañeros y excompañeros del laboratorio A-13: Alexander, Mariana, Rafael, Jimena, Arafat, Giovana, Nidia, Nadia, Katy, Alberto, Liz y Nayla por su amistad y consejos; al laboratorista, el Lic. Cutberto Dorado, por su actitud positiva y su ayuda en algunos experimentos; al Lic. Carlos Lozano Flores, Técnico Académico, por haberme introducido en las técnicas de biología molecular y haberme apoyado durante toda la realización del proyecto; a la M. en C. Paola Bello Medina por ayudarme en varios experimentos e incluso suplirme cuando me vi imposibilitada; al Lic. Edgar Morales por su ayuda constante en especial para establecer los métodos de microscopía; al Dr. Jean Pascal Morin y a la Dra. Livia Sánchez Carrasco por su interés en el planteamiento experimental y sus sabios consejos; y a los tesisistas de licenciatura Mayra Guerra Zamora e Iván Gallegos Almanza por su valiosa y crucial ayuda en múltiples experimentos.

### ***Dedicatoria:***

Agradeciéndoles de corazón, dedico este trabajo a mi familia: a mi padre Alejandro, a mi madre Catalina y a mi hermana Samara, quienes me brindan todo lo que necesito para cumplir mis metas. Agradezco a Jorge por el apoyo sentimental durante todo este tiempo. Agradezco también a mis queridas Cecilia y Luisa Fernanda, a mis abuelitos Dimas y Olga, y a toda mi familia y mis amigos por apoyarme y animarme siempre.

## Índice

AGRADECIMIENTOS .....	ii
Dedicatoria: .....	v
Índice .....	vi
1. RESÚMENES .....	1
2. INTRODUCCIÓN .....	3
2.1 De la codificación de la memoria .....	3
2.2 De las metodologías disponibles.....	9
2.3 Comparación de la inducción de algunos IEGs. ....	15
2.4 El promotor mínimo de <i>Arc/Arg3.1</i> .....	18
3. ANTECEDENTES .....	21
3.1 El ratón ‘Tet-Tag’ .....	21
3.2 Diseño previo del sistema de regulación .....	25
3.3 Evaluación piloto del efecto de los antibióticos reguladores.....	33
4. JUSTIFICACIÓN.....	36
5. HIPÓTESIS .....	38
6. OBJETIVOS.....	39
7. MATERIAL Y MÉTODOS .....	40
7.1 Evaluación del efecto de la Novobiocina.....	40
7.2 Construcción del sistema de vectores .....	43
7.3 Evaluación del sistema en cultivos neuronales .....	49
8. RESULTADOS .....	53
8.1 El efecto de Novobiocina en la actividad neuronal .....	53
8.2 De la construcción del sistema de regulación propuesto .....	57
8.3 De las pruebas en la línea neuronal.....	62
9. DISCUSIÓN.....	69
9.1 De la evaluación del efecto de la Novobiocina .....	70
9.2 De la evaluación del promotor mínimo .....	72
10. CONCLUSIONES .....	79
11. PERSPECTIVAS: .....	80
12. REFERENCIAS Y RECURSOS.....	81
13. LISTA DE ABREVIATURAS .....	91
14. LISTA DE FIGURAS .....	94
15. LISTA DE TABLAS .....	104
16. MATERIAL ANEXO.....	105

# **1. RESÚMENES**

## 1.1 Resumen

### SISTEMA INDUCIBLE PARA MARCADO DE NEURONAS ACTIVADAS DURANTE EL APRENDIZAJE DE UNA TAREA CONDUCTUAL

El cerebro procesa y almacena información mediante modificaciones en las sinapsis de las redes neuronales, las cuales requieren la modificación de proteínas existentes y la transcripción de nuevas para estabilizar los cambios. Con el objetivo de identificar y caracterizar los grupos de neuronas involucrados en la codificación de la información que se almacena en la memoria a largo plazo, se diseñó un sistema inducible de regulación génica. El sistema utiliza el promotor mínimo de uno de los genes regulados por los procesos de memoria y aprendizaje (*Arc/Arg3.1*) para condicionar la expresión de un reportero fluorescente a la actividad neuronal. Se construyó el promotor mínimo de *Arc/Arg3.1* y se sugiere que es inducido por NGF en células de Neuroblastoma-2A transfectadas. Además, debido a que el sistema requiere de la administración de Novobiocina para delimitar la ventana de marcado de la actividad neuronal, se evaluó su efecto sobre la actividad poblacional espontánea de la región CA1 hipocampal de rebanadas de cerebro de ratón. Los datos sugieren que concentraciones alrededor de la necesaria *in vitro* para frenar el sistema de inducción no alteran la actividad poblacional espontánea. Por lo tanto parece viable utilizar el sistema para marcar de forma permanente a las neuronas que son activadas durante una ventana temporal discreta en la que ocurra estimulación sensorial o conductual.

## 1.2 Abstract

### AN INDUCIBLE SYSTEM FOR TAGGING NEURONS ACTIVATED DURING THE LEARNING OF A BEHAVIORAL TASK

The brain processes and stores information through synaptic modifications of neural networks, which require the modification of existing proteins and transcription of new ones to stabilize these changes. Aiming to identify and characterize the groups of neurons involved in information coding of long-term memory, we have designed an inducible system for gene regulation. The system relies on the minimal promoter of a gene which is regulated by the processes of memory and learning (*Arc/Arg3.1*), to condition the expression of a fluorescent reporter to neuronal activity. We built the minimal promoter of *Arc/Arg3.1* and suggest that it is induced by NGF in transfected cells of Neuroblastoma-2A. Besides, given that the system requires the administration of Novobiocin for delimitating the tagging window of neuronal activity, its effect on the spontaneous population activity of CA1 hippocampal region in mouse brain slices was evaluated. Data suggest that concentrations flanking the one needed *in vitro* for stopping the induction system do not alter the spontaneous population activity. Therefore, the gene-regulation system seems reliable for permanently tagging the neurons activated during a discrete temporal window during which behavioral or sensory stimulation takes place.

## **2. INTRODUCCIÓN**

### **2.1 De la codificación de la memoria**

La memoria es un proceso cognitivo que se estudia actualmente desde diferentes niveles de análisis. Estos incluyen el análisis de la conducta, la identificación de estructuras cerebrales involucradas, la caracterización de la actividad neuronal con resolución celular, los cambios neuro-anatómicos en las neuronas y sus procesos, y los eventos moleculares que subyacen a las modificaciones en la conducta de un organismo.

Para comprender e integrar adecuadamente los mecanismos que permiten la formación y el mantenimiento de la memoria, en el pasado se generaron teorías que buscaban explicar cómo es que las redes neuronales codificaban la información y la hacían persistir a lo largo del tiempo. El mecanismo más aceptado para explicar cómo podría darse dicho proceso de codificación fue el propuesto por el psicólogo canadiense Donald O. Hebb en 1949. Su idea fundamental consistió en considerar al “ensamble neuronal” como la unidad básica del procesamiento de la información en el sistema nervioso central (SNC), y enunció el llamado ‘postulado neurofisiológico’ que propone que las conexiones entre células nerviosas co-activadas se refuerzan a través de cambios moleculares y/o estructurales (mecanismos que actualmente se definen como ‘plasticidad sináptica’) de manera que la actividad subsecuente de un subgrupo de neuronas que componen el ensamble involucrado, llevará a la activación del ensamble completo y por lo tanto a la recapitulación de la actividad desencadenada por el evento original. Es por ello que la teoría del ensamble neuronal propuesta por Hebb implica que durante la evocación de la memoria o recuperación de la información - ya sea ante la estimulación sensorial (‘en línea’) o en ausencia de estimulación (‘fuera de línea’) - la red activa los mismos ensambles neuronales reclutados durante la adquisición de la información que era novedosa.

Así, con el ensamble siendo la instancia más simple del proceso de representación de la información, las células podrían reproducir un patrón de actividad aun cuando el estímulo ya no esté presente. Esto debido a que el ensamble neuronal ya organizado es capaz de originar actividad subsecuente que dé lugar a las propiedades emergentes de las redes neuronales que son capaces de adquirir información y que al estabilizar la capacidad de

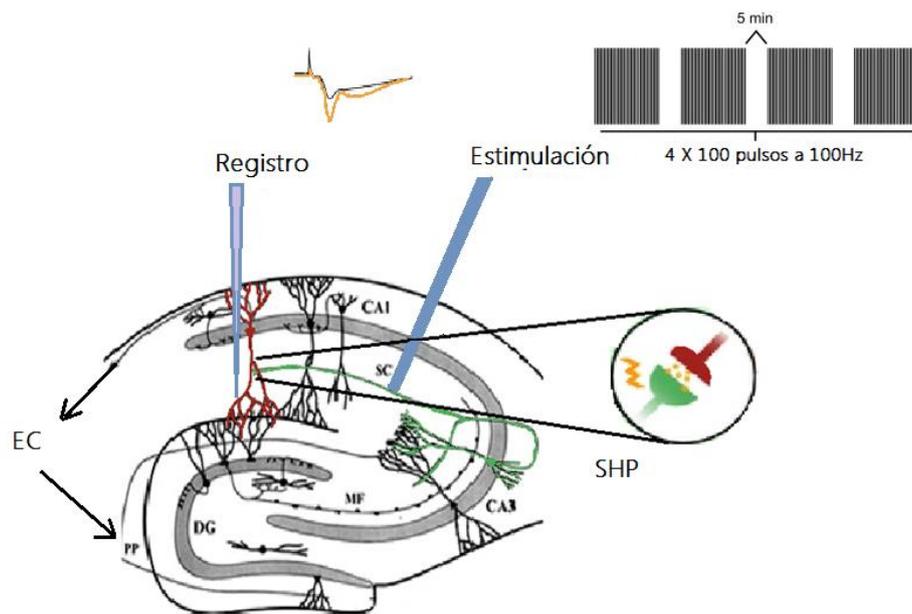
reproducir los patrones de actividad por medio de cambios plásticos en las sinapsis que las conforman, dan lugar a la memoria.

En cuanto a las estructuras cerebrales involucradas en el almacenamiento de información, se sabe que el hipocampo es una estructura crucial para la adquisición de memorias episódicas y espaciales (Scoville y Milner, 1957). Se asume que después de la codificación ocurre la consolidación para estabilizar la memoria y retenerla a largo plazo, en un proceso durante el cual los trazos de memoria se distribuyen en el hipocampo y en áreas conexas como la neocorteza (Squire, 1992).

La anatomía básica del hipocampo (ver figura 1) ha inspirado para proponer cómo el SN procesa la información mediante el flujo de información en serie y paralelo a través de diversas subestructuras. En general, la información entra al hipocampo desde la corteza entorrinal que proyecta a las células granulares del giro dentado y a las células piramidales de las áreas CA3 y CA1. A su vez, CA3 tiene proyecciones dentro de CA3 mediante las fibras de asociación y comisurales, y hacia CA1 mediante las colaterales de Schaffer, así como también recibe sinapsis del giro dentado mediante las fibras musgosas. La información sale del hipocampo desde CA1 mediante proyecciones a la corteza entorrinal y el subículum, así como mediante el fórnix hacia los cuerpos mamilares y el núcleo anterior del tálamo (Schultz y Rolls, 1999). Es por ello que esta estructura ha sido el modelo por excelencia para los estudios de la plasticidad sináptica en el contexto del mecanismo putativo de almacenamiento de la información en el cerebro (Neves et al., 2008).

Debido al papel crucial del hipocampo en la formación de la memoria, fue en esta estructura dónde se estudiaron por primera vez los paradigmas experimentales de los cambios plásticos de largo plazo en las sinapsis: la potenciación a largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés: 'Long Term Potentiation') y de la depresión a largo plazo (LTD, por sus siglas en inglés: 'Long Term Depression'). La LTP consiste en un aumento de larga duración en la transmisión sináptica como resultado de una corta (e.g. 1 seg) estimulación con una frecuencia alta (e.g. 100 Hz) en las vías aferentes, como las colaterales de Schaffer en el hipocampo (ver figura 1) (Bliss y Lømo, 1973; Lømo, 1966; McNaughton et al., 1986). Mientras que la LTD consiste en un decremento de larga duración en la transmisión sináptica resultante de una estimulación prolongada con una frecuencia baja (e.g. 1 Hz) en las vías

aferentes (Bliss y Collingridge, 1993; Malenka, 1994). La LTP y la LTD son procesos que cumplen el postulado Hebbiano debido a que su inducción requiere la actividad coincidente de neuronas presinápticas y postsinápticas (Neves et al., 2008).

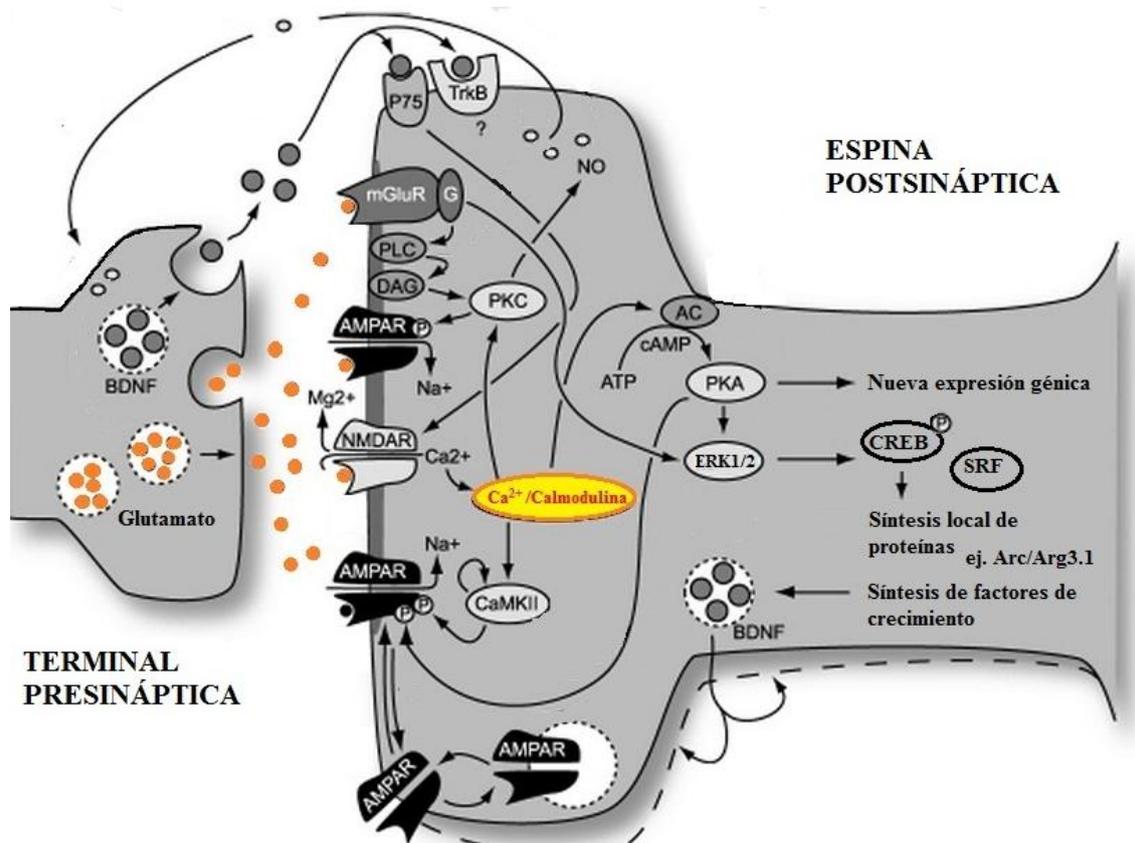


**Figura 1.-** Figura modificada de Schultz y Rolls, 1999. Anatomía básica de la formación hipocámpal ejemplificando una sinapsis. La información entra al hipocampo desde la corteza entorrinal (EC) mediante la vía perforante (PP), la cual proyecta al giro dentado (DG) que contiene células granulares y a las áreas CA3 y CA1 del hipocampo que contienen células piramidales. CA3 tiene proyecciones recurrentes dentro de CA3 y también hacia CA1 mediante las colaterales de Schaffer (SC). CA3 también recibe sinapsis del DG mediante las fibras musgosas (MF). La información sale del hipocampo mediante proyecciones a la EC y el subículo desde CA1, así como mediante el fórnix hacia los cuerpos mamilares y el núcleo anterior del tálamo (no ilustrado). CA1, CA3 y DG también reciben entradas colinérgicas del septum medial por la vía septo-hipocámpal (SHP). Se muestra además la inducción de LTP mediante estimulación de alta frecuencia. Se aplican 4 trenes de 100 pulsos a 100Hz espaciados 5 min en las colaterales de Schaffer, y se registran las dendritas de las neuronas piramidales de CA1, para identificar la potenciación de largo plazo que se muestra como un aumento en la en la pendiente de la respuesta (en amarillo).

Ambos modelos se proponen como un mecanismo de codificación de la memoria, ya que se ha demostrado que tanto la LTP como la LTD ocurren endógenamente bajo condiciones específicas de aprendizaje, y esto apoya la teoría de que estas formas de plasticidad sináptica constituyen los correlatos celulares de la memoria (Whitlock et al., 2006). Además, hoy en día se sabe que comparten varias propiedades celulares y moleculares con las formas persistentes de memoria dependiente del hipocampo (Goh y Manahan-Vaughan, 2013).

Los mecanismos moleculares (ver figura 2) que subyacen la inducción de las formas canónicas tanto de la LTP como de la LTD son desencadenados por la activación de los receptores ionotrópicos de glutamato de tipo NMDA (por sus siglas en inglés: ‘N-methyl-D-aspartate’), y AMPA (por sus siglas en inglés: ‘ $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid’) que ocurre por la liberación de glutamato de las vesículas de la presinapsis. Los receptores tipo NMDA son canales bloqueados por iones de  $Mg^{2+}$  que evitan el flujo de corriente cuando la membrana se encuentra en el potencial de reposo, sin embargo, ante la despolarización de la célula postsináptica se expulsa el  $Mg^{2+}$  de los canales NMDA y permiten entrada de calcio a la célula, lo cual es indispensable para desencadenar los cambios plásticos (Purves et al., 2001). Específicamente, la actividad de los receptores NMDA que desencadena LTP depende de la presencia tanto de glutamato como de un co-agonista que puede ser glicina ó D-serina (Bashir et al., 1990; Johnson y Ascher, 1987). Y finalmente, lo que determina la polaridad de la plasticidad inducida es el patrón temporal y la concentración del  $Ca^{2+}$  transitando por la célula, la cual determina el balance de cinasas y fosfatasa activas; flujos prolongados y moderados inducen LTD, mientras que flujos marcados y cortos inducen LTP (Bliss y Cooke, 2011).

En el caso de la LTP, el incremento de  $Ca^{2+}$  intracelular en las espinas dendríticas de la neurona postsináptica activa la  $Ca^{2+}$ /calmodulina, que a su vez activa numerosas cinasas como la dependiente de  $Ca^{2+}$ /calmodulina (CaMKII), la proteína cinasa C (PKC) y la proteína cinasa A (PKA) mediante la adenilato ciclasa (AC). La CaMKII a su vez activa a los receptores AMPA resultando en un mayor incremento de  $Ca^{2+}$  intracelular. La PKA activa por su parte a la cinasa regulada extracelularmente (ERK1/2), la cual activada resulta en la fosforilación de una gran cantidad de genes blanco, que incluyen al factor de transcripción CREB (por sus siglas en inglés: ‘cyclic AMP response element binding protein’). Es así como se orquesta una fina regulación de la expresión de varios genes que subyacen a la plasticidad sináptica y la formación de memorias de largo plazo (Lynch, 2004; Miyamoto, 2006; Purves et al., 2001).



**Figura 2.-** Figura modificada de Bliss y Cooke, 2011. Modelo de los eventos moleculares que contribuyen a los cambios plásticos en las sinapsis. Tomando como ejemplo la potenciación a largo plazo (LTP), se inicia con la liberación de glutamato de la presinapsis, lo cual, aunado a la depolarización activa a los receptores NMDA y conlleva al flujo de Ca<sup>2+</sup> en la neurona postsináptica. El aumento en el Ca<sup>2+</sup> intracelular activa a la Ca<sup>2+</sup>/calmodulina, que a su vez activa numerosas cinasas y fosfatasas. La CaMKII fosforila a los receptores AMPA en la membrana y promueve la inserción de más receptores. La fase tardía de la LTP se obtiene al reclutar la AC que activa a la PKA y a ERK1/2. Estas cinasas se translocan al núcleo y activan factores de transcripción como CREB y MEF, que activan a genes blanco como *Arc* y BDNF y en conjunto permiten los cambios estructurales en las sinapsis. Se ilustra también la LTD dependiente de los mGluR, los cuales activan una cascada de señalización que rompe el lípido de membrana PIP<sub>2</sub> - mediante la PLC- en IP<sub>3</sub> y DAG, que liberan el calcio intracelular y activan la PKC respectivamente. La PKC disminuye la conductancia de los receptores AMPA y ocurre LTD junto con la liberación de NO a la presinapsis. AC, adenilato ciclasa; AMPAR, receptores de ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico ; *Arc*, proteína del citoesqueleto regulada por actividad; ATP, adenosina trifosfato; BDNF, factor neurotrópico derivado de cerebro; cAMP, adenosina monofosfato cíclica; CaMKII, cinasa dependiente de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina II; CaN, calcineurina/PP2B; CBP, proteína de unión a CREB; CREB, proteína de unión al elemento responsivo a AMP cíclico; CRTC, co-activador de transcripción regulado por CREB; DAG, diacilglicerol; ERK1/2, cinasa regulada extracelularmente; IP<sub>3</sub>, inositol trifosfato; MEF2, factor 2 potenciador de miocitos; mGluR, receptores

metabotrópicos a glutamato del grupo 1; NMDAR, receptores de N-metil-D-aspartato; NO, óxido nítrico; p75, receptor a neurotrofinas; PIP2, fosfatidil inositol trifosfato; PKA, cinasa dependiente de AMP cíclico; PKC, proteína cinasa C; PLC, fosfolipasa C; SRF, elemento responsivo al suero; TRKB, cinasa B relacionada a tropomiocina.

Uno de los genes regulados y reguladores de los cambios plásticos en la sinapsis es la neurotrofina BDNF (por sus siglas en inglés: ‘Brain Derived Neurotrophic Factor’), que es producida y liberada durante la actividad sináptica, su secreción activa a sus receptores TRKB y P75 tanto en la pre- como la postsinapsis, y esto resulta crucial para la inducción y el mantenimiento de la LTP (Bliss y Cooke, 2011; Park y Poo, 2013). En el establecimiento de la plasticidad sináptica también juegan papeles importantes otros receptores, como son los receptores metabotrópicos a glutamato del grupo 1 (mGluR), de los cuales depende una forma de LTD (ver figura 2). Al unirse el glutamato a los mGluR, estos activan una cascada de señalización que rompe el lípido de membrana PIP2- mediante la fosfolipasa C (PLC)- en IP3 y diacilglicerol (DAG), que liberan el calcio intracelular y activan la PKC respectivamente. A su vez la PKC disminuye la conductancia de los receptores AMPA y ocurre LTD (Bliss y Cooke, 2011; Wang et al., 2007).

De cualquier forma, el factor determinante resulta ser la compleja regulación de los genes de expresión inmediata temprana (IEGs por sus siglas en inglés: ‘Immediate Early Genes’), que son genes que se expresan inmediatamente después de la experiencia y determinan el establecimiento de los cambios neuronales a largo plazo (Lanhan y Worley, 1998; Morgan y Curran, 1991; Okuno, 2011). Es así como se propone que los cambios moleculares dirigen cambios celulares que modifican la conectividad de neuronas que conforman ensambles específicos representando la formación de un trazo de memoria, y que estos trazos dependen de la manera en que la actividad neural estructurada pueda modificar los patrones de conectividad en los circuitos neuronales (Buzsáki, 1989).

## **2.2 De las metodologías disponibles**

A pesar de la existencia de teorías y modelos acerca de cómo se lleva a cabo la codificación de la memoria por grandes grupos de neuronas y múltiples áreas cerebrales, aún quedan muchas preguntas por resolver debido a la falta de herramientas propias para ello (Kreiman et al., 2004). En este respecto, la propuesta Hebbiana provee la teoría acerca de los mecanismos que subyacen la codificación y recuperación de la memoria, y recientemente se han obtenido pruebas cruciales que apoyan dicha teoría.

Algunos estudios de neuroimagen, en donde se utiliza principalmente resonancia magnética funcional (Kahn et al., 2004; Polyn et al., 2005) muestran que la actividad cerebral presente durante el aprendizaje ocurre de nuevo durante el recuerdo. Sin embargo, la actividad neuronal medida con las técnicas de resonancia magnética funcional refleja los cambios del flujo sanguíneo asociados con la actividad en regiones amplias del sistema nervioso, de manera que la actividad identificada es una consecuencia tardía de la actividad neuronal y además su resolución anatómica es poco precisa. De manera similar, el encefalograma (medición de las fluctuaciones de voltaje resultantes de los flujos iónicos entre las neuronas) también presenta límites espaciales a pesar de que se gana resolución temporal con respecto a la resonancia magnética funcional. El principal problema con estas metodologías es que no permiten caracterizar las unidades neuronales que codifican la información que ha de almacenarse en la memoria.

Debido a su excelente resolución temporal que identifica potenciales de acción, diferentes técnicas de electrofisiología suelen utilizarse para estudiar la actividad neuronal. Sin embargo, dada su naturaleza invasiva, mantener registros electrofisiológicos en las mismas neuronas por lapsos de tiempo prolongados resulta difícil ya que derivan en necrosis del tejido. Además, con los registros electrofisiológicos se tienen limitaciones neuro-anatómicas que no permiten un mapeo de la actividad con resolución de células individuales en la totalidad del sistema nervioso central (SNC). A manera de ejemplo se tiene el estudio de Gelbard-Sagiv y colaboradores (2008), quienes registraron neuronas individuales en humanos durante la adquisición y la evocación de memoria episódica. En este estudio, participaron 13 pacientes con epilepsia a quienes se les había implantado electrodos en el lóbulo temporal medial y el cíngulo anterior con el objetivo de identificar los foci responsables de los

episodios epilépticos. Se sometió a los pacientes a secciones de avistamiento de videoclips, y después de 5 min se les pidió narrar libremente los episodios que habían visto. Observaron que algunas unidades del ensamble neuronal en el hipocampo y corteza entorrinal involucrado en la percepción (interpretado como las 46 neuronas que mostraron una respuesta estable y específica durante la presentación de videoclips), incrementan su tasa de disparo justo antes del recuento verbal de esos mismos videoclips, y se vió que esta actividad persistía incluso pocos segundos después de que el estímulo había cesado. Esto conllevó a la importante implicación de que un subgrupo de las neuronas implicadas durante la adquisición son las responsables de la retención de la información en la memoria de corto plazo.

Sin embargo, no parece razonable intentar hacer inferencias acerca del porcentaje real de reactivación neuronal que se tendría en todo el sistema nervioso a partir de las relativamente pocas neuronas registradas, las cuales no informan sobre el número de unidades neuronales que constituyen al ensamble total, y por lo tanto se evidencian los inconvenientes de esta clase de estudios. Es por ello que se requerirían nuevos avances tecnológicos para responder con precisión las preguntas acerca de las poblaciones de unidades neuronales involucradas en la formación de la memoria de largo plazo (Shirvalkar, 2009). Por lo tanto, a pesar de los avances remarcables en las técnicas de imagen funcional y electrofisiología *in vivo*, estas herramientas no permiten caracterizar la actividad de neuronas individuales en todo el sistema nervioso.

Por ello, para poder identificar a las unidades neuronales que forman los ensambles neuronales que codifican la información y la mantienen a largo plazo, resulta imprescindible la implementación de técnicas que permitan detectar con resolución celular la actividad neuronal y generar mapas de ésta en todo el SNC. Una estrategia consiste en utilizar la detección de la expresión de IEGs como reporteros de actividad neuronal. Estos genes (como *c-Fos*, *Arc/Arg3.1*, *Zif268/egr1* y *Homer1a*) se expresan inmediatamente en respuesta a actividad neuronal que se induce por un estímulo o una conducta sin requerir síntesis de nuevas proteínas (Miyashita et al., 2008).

Avances en la microscopía confocal permitieron el desarrollo de metodologías como el ‘Análisis celular Compartamental de la actividad Temporal por Hibridación In Situ Fluorescente’ (catFISH por sus siglas en inglés: ‘cellular Compartment Analysis of Temporal

activity by Fluorescence In Situ Hybridization'). Dicha técnica permite identificar con resolución celular aquellas neuronas que se han activado por uno de dos estímulos o conductas separados por un periodo de 30 minutos, al identificar la localización del ácido ribonucleico (ARN) mensajero de interés en las neuronas activadas en dos tiempos distintos. Utilizando los transcritos del gen *Arc/Arg3.1* como marcador de actividad neuronal, mediante catFISH se puede identificar a las neuronas que se han activado 5 minutos antes de sacrificar al animal (presentando tinción nuclear) y compararlas con las que se activaron más de media hora antes (presentando tinción citoplásmica), gracias a que la dinámica de exportación del transcrito del núcleo al citoplasma dura aproximadamente 30min (Guzowski, et al., 1999).

A pesar de no tener una resolución temporal que refleje potenciales de acción, esta técnica es un avance para investigar la asociación entre los ensambles neuronales y el comportamiento o la experiencia; la capacidad de generar mapas de activación neuronal en todo el cerebro relacionados a dos eventos distintos en la experiencia del mismo animal representa un avance sumamente útil para comprender las bases celulares de la cognición en general, ya que permite estudiar las interacciones dinámicas entre las redes neuronales ampliamente distribuidas en el cerebro que están codificando la información y conforman los circuitos cerebrales responsables de comportamientos específicos (Guzowski et al, 2005).

Utilizando FISH combinada con inmunohistoquímica, Ramírez-Amaya y colaboradores (2005) dieron la primera demostración de traducción en redes neuronales específicas como consecuencia de una tarea espacial, y sugirieron que los IEGs son importantes para los cambios tardíos en las sinapsis de circuitos específicos. En este trabajo, ratas fueron sometidas a explorar un ambiente novedoso, y después de distintos lapsos temporales, fueron re-expuestas a ese ambiente y sacrificadas 5 min después. De esta manera, las neuronas con transcrito de *Arc/Arg3.1* nuclear identificadas con FISH correspondían a los ensambles activados durante la segunda exploración, mientras que las neuronas con proteína *Arc* revelaron los ensambles activados durante la primera exposición al ambiente. Las neuronas con ambos marcapos correspondían a las neuronas re-activadas ante la re-exposición al ambiente novedoso. En el caso de la corteza parietal, el porcentaje de reactivación en el grupo de ratas que espaciaron ambas exploraciones por 30 min fue de 92%, mientras que en las que se espaciaron por 1 h el porcentaje fue de 83% del total de neuronas marcadas con la

proteína *Arc/Arg3.1* (Ramírez-Amaya et al, 2005). Aunado a esto, demostraron también que ocurre una segunda oleada de expresión de la proteína de *Arc/Arg3.1* 8 hrs después de la exploración, en la cual el tamaño de los ensambles de neuronas expresando *Arc* eran entre el 40 y el 55% del tamaño de los ensambles activados inicialmente en las estructuras estudiadas, lo cual se relaciona con la reactivación neuronal fuera de línea (Ramírez-Amaya et al, 2005).

Una variante de la imagenología con catFISH explota las diferencias en los perfiles de expresión de dos IEGs: *Arc/Arg3.1* y *Homer1a* (Guzowski et al., 2005; Vazdarjanova y Guzowski, 2004). Similar al catFISH con *Arc/Arg3.1*, las neuronas activadas previamente al sacrificio del animal se identifican por los focos de transcripción nucleares de *Arc/Arg3.1*, pero las neuronas que se activaron 30 min antes son marcadas por los transcritos nucleares de *Homer1a*. Así, el catFISH de *Arc/Arg3.1* y *Homer1a* ha sido utilizado para probar las dinámicas del procesamiento informacional en el hipocampo mediante la comparación de las respuestas de ensambles neuronales en CA3 (*Cornu Ammonis III*) y CA1 (*Cornu Ammonis I*) con ciertas perturbaciones del ambiente al que fueron expuestos (Vazdarjanova y Guzowski, 2004).

Aunado a la necesidad de amplitud de cobertura anatómica con resolución celular para conocer cómo operan los ensambles neuronales en la formación de la memoria, el estudio de la memoria de largo plazo plantea aún más dificultades que el estudio de la memoria de corto plazo estudiada por Gelbard-Sagiv y colaboradores (2008) ó por los estudios mencionados implementando la técnica de catFISH (Guzowski et al., 1999 y 2005; Ramírez-Amaya et al, 2005; Vazdarjanova y Guzowski, 2004), debido a las exigencias temporales inherentes a su evaluación; se requeriría la capacidad de registrar la actividad de una gran cantidad de neuronas individuales durante varios días ó incluso semanas.

Otra aproximación que ha resultado valiosa para probar parcialmente la teoría propuesta por Hebb acerca de la formación de la memoria y su recuperación, ha sido el trabajo de Han y colaboradores (2009). Habiendo identificado que las neuronas involucradas en la expresión del miedo condicionado sobre-expresan la proteína CREB y por lo tanto son prestas a ser reclutadas en un trazo de memoria, utilizaron un sistema inducible que expresaba el receptor a la toxina difteria únicamente en neuronas sobre-expresando CREB de manera artificial. El sistema inducible depende de la inyección de un vector codificando para la

proteína CREB y la recombinasa CRE para dotar la especificidad neuronal, asegurando que el receptor a la toxina se expresará (mediante la acción de la recombinasa) únicamente en aquellas células que internalizaron el vector y sobre-expresan CREB. De esta manera, al administrar la toxina probaron que al eliminar estas neuronas después del condicionamiento, se eliminaba la conducta del miedo condicionado, y por lo tanto se intuye que eliminaron el trazo de memoria. Si bien esta técnica provee una evidencia sólida de que la memoria se codifica mediante ensambles neuronales que se deben reactivar al evocar memorias, la configuración artificial (al sobre-expresar CREB) deja severas dudas en cuanto al funcionamiento del sistema “intacto”. Además, este diseño no pretende ni puede mapear la actividad neuronal endógena de todo el sistema nervioso en dos tiempos alejados como para permitir el estudio de las dinámicas de los ensambles que codifican la memoria.

Otra innovación tecnológica considerablemente reciente e impactante en este campo ha sido la optogenética. Mediante la implementación de genes que codifican para opsinas (Boyden et al., 2006; Deisseroth et al., 2006), se ha logrado una precisión temporal y celular inigualable. Al inducir estas moléculas responsivas a estímulos luminosos se logra imprimir un control de la actividad neuronal en escala de milisegundos. En general, al condicionar la expresión de estos genes en ciertos tipos celulares y además inducir específicamente ciertas neuronas, dichos avances representan la base para futuros estudios que busquen determinar el papel de grupos específicos de neuronas en procesos cognitivos, mediante la disección temporal, genética y espacial de los circuitos neuronales (Goshen et al., 2011). No obstante, la ventaja de seleccionar específicamente ciertas células para manipular su actividad, resulta en una desventaja bajo el planteamiento del requisito del mapeo masivo para comprender cómo las poblaciones de ensambles distribuidos en todo el cerebro permiten la codificación de la memoria.

Recapitulando, en los últimos años se han obtenido evidencias que apoyan la teoría del ensamble Hebbiano. Si bien las técnicas de neuroimagenología demuestran una reactivación a nivel de estructuras y zonas relativamente amplias del cerebro ante la evocación de la memoria, no son viables para probar la teoría de Hebb a nivel celular. El estudio electrofisiológico (Gelbard-Sagiv et al. 2008) de humanos mencionado sugiere que para recordar episodios de nuestra vida, neuronas específicas en el hipocampo que se

activaron durante la experiencia inicial se reactivan durante el recuerdo de dicha experiencia. A pesar de ser una prueba irrefutable de la reactivación de unidades neuronales ante el recuerdo, no permite aportar detalles fundamentales que nos permitan caracterizar la forma en cómo funcionan los ensamblajes neuronales; por ejemplo, determinar el número de unidades involucradas en la reactivación de un recuerdo en diferentes regiones del SNC.

Es por ello que la evaluación de la transcripción de *Arc/Arg3.1* con microscopía confocal y FISH ha devenido en una herramienta sumamente útil para identificar a la actividad neuronal involucrada en distintas etapas conductuales y regiones cerebrales, y ejemplifica la versatilidad de los IEGs para mapear la actividad en todo el SNC con buena resolución temporal, y excelente resolución celular (Chawla et al., 2005; Guzowski et al., 1999, 2005; Ramirez-Amaya et al., 2005; Vazdarjanova y Guzowski, 2004).

Otras técnicas innovadoras (Boyden et al., 2006; Deisseroth et al., 2006; Han et al., 2009) involucran la expresión de transgenes para manipular la actividad neuronal, y de esta forma han demostrado que ensamblajes determinados de neuronas involucrados en el aprendizaje son responsables de la codificación, mantenimiento y recuperación de la información en el sistema nervioso. Si bien son invaluable las evidencias que soportan el postulado Hebbiano, los trabajos mencionados no evalúan las dinámicas de actividad de poblaciones neuronales dispersas como se requeriría para generar modelos de la formación de la memoria de corto y largo plazo.

Finalmente, como se mencionará posteriormente, hoy en día también se tiene la capacidad de monitorear repetidamente los patrones de actividad resultado de la conducta del animal gracias al desarrollo de ratones transgénicos que expresan una proteína fluorescente bajo el control del promotor de un IEG determinado, lo que confiere un amplio espectro de ventajas, y por lo tanto, la mejor opción para abordar el problema de la formación de la memoria de largo plazo.

### 2.3 Comparación de la inducción de algunos IEGs.

El mapeo de la expresión de ‘genes de expresión inmediata temprana’ (IEGs) es un método poderoso para identificar la localización y temporalidad de poblaciones neuronales activadas porque su expresión refleja la actividad reciente de la neurona (Okuno, 2011). Se ha demostrado que las distintas etapas del aprendizaje repercuten diferencialmente en los patrones de expresión génica de maneras complejas. Ante distintas tareas, los genes cuya expresión aumenta con mayor frecuencia son *Arc/Arg3.1*, *Homer1a*, *Zif268*, *Egr-4*, *Jun-B* y *c-Fos*, pero existen otros genes sobre-regulados, e inclusive varios cuya expresión disminuye ante las mismas tareas. Esto conlleva a considerar que existe una red base de expresión génica neuronal que se induce por el procesamiento de información, y otros genes que confieren plasticidad dependiente de estado, permitiendo así la variedad de procesos plásticos que subyacen a la memoria (Miyashita et al., 2008).

De entre varios de estos genes, *c-Fos* ha sido ampliamente utilizado para mapear la actividad neuronal, sin embargo, su umbral de inducción resulta relativamente alto y por lo tanto se debe utilizar como indicador únicamente en paradigmas conductuales que involucren un componente cognitivo ó emocional suficientemente fuerte, como el condicionamiento al miedo (Okuno, 2011; Waltereit et al., 2001; Wisden et al., 1990; Worley et al., 1993).

La expresión de otro de estos genes, *Zif268/Egr1*, está relacionada con la memoria que resulta del condicionamiento al miedo y al contexto, ya que ambos paradigmas inducen su expresión en la amígdala y la región CA1 hipocampal (Cole et al., 1990; Hall et al., 2001; Okuno, 2011; Reijmers et al., 2007; Worley et al., 1993). Muestra además especificidad de región y temporalidad; por ejemplo, mientras que en CA1 se induce *Zif268* más eficientemente por una prueba de memoria reciente, en cortezas de asociación (como la corteza temporal, prefrontal medial y cingulada anterior) se induce más durante una prueba de memoria remota (Frankland et al., 2004; Okuno, 2011; Sacco y Sacchetti, 2010). Por otro lado, *Zif268* se ha utilizado para estudiar el remapeo de las células de lugar en el giro dentado del hipocampo, ya que su expresión provee datos similares a los obtenidos con registros electrofisiológicos en condiciones comparables (Satvat et al., 2011).

*Arc/Arg3.1* es otro IEG que ha recibido especial atención debido a que tanto su transcripción como su traducción se inducen dinámicamente en respuesta a actividad neuronal

asociada con el procesamiento de información en una modalidad de “todo ó nada”, y están directamente involucradas en la plasticidad sináptica y la consolidación de la memoria (Guzowski et al., 1999; Miyashita et al., 2008; Ramirez-Amaya et al., 2005, Vazdarjanova y Guzowski, 2004). Este IEG codifica para una proteína efectora que está altamente conservada en vertebrados y su expresión se induce ante distintos estímulos y diferentes paradigmas conductuales en varias especies (Bock et al., 2005; Velho et al., 2005).

La gran ventaja de *Arc/Arg3.1* como indicador de actividad neuronal radica en que es expresado en redes neuronales definidas conductualmente, como lo demuestra el hecho de que la exploración de diferentes ambientes induce la expresión de *Arc/Arg3.1* en poblaciones diferentes de neuronas hipocampales, mientras que la repetición del ambiente recluta ensambles muy similares en el hipocampo (Guzowski et al., 1999; Vazdarjanova et al., 2002). En lo que respecta a su expresión basal, durante el reposo ó en animales control que permanecen en la caja-habitación, la transcripción de *Arc/Arg3.1* se detecta en baja proporción en el hipocampo y la neocorteza. Sin embargo, la expresión de Arc es intensa cuando se produce una estimulación que induce LTP (Link et al., 1995; Lyford et al., 1995). Adicionalmente, la expresión de Arc correlaciona con la actividad neuronal en el hipocampo (CA1 y CA3) y neocorteza de roedores ante la exploración de ambientes novedosos (Guzowski et al., 1999, 2000 y 2006; Okuno, 2011; Ramírez-Amaya et al., 2005; Vazdarjanova y Guzowski, 2004), así como durante la ejecución de tareas conductuales que prueban la memoria espacial, olfativa, de condicionamiento al miedo y condicionamiento operante (Barot et al., 2009; Carpenter-Hyland et al., 2010; Desgranges et al., 2010; Gusev et al., 2005; Gusev et al., 2010; Guzowski y Worley, 2001; Kelly y Deadwyler, 2003; Mamiya et al., 2009; Ploski et al., 2008; Rapanelli et al., 2010; Saddoris et al., 2009).

Cabe resaltar que se ha demostrado que la proporción de células activadas en la corteza parietal y las regiones CA1 y CA3 del hipocampo resulta similar a los datos obtenidos con los registros electrofisiológicos (Barnes et al., 1990; Guzowski et al., 2006; McNaughton et al., 1994; Qin et al., 1997). Adicionalmente, los estudios de catFISH con *Arc/Arg3.1* y *Homer1a* mencionados previamente demuestran que la activación de estos genes en CA1 y CA3 son consistentes tanto cuantitativa como cualitativamente con los registros unitarios de la compleja actividad de espigas de neuronas hipocampales (Guzowski et al., 2004, 2006).

Por lo tanto, se concluye que al menos en estas estructuras cerebrales, los potenciales de acción son suficientes para activar la transcripción de *Arc/Arg3.1* y *Homer1a* (Miyashita et al., 2008).

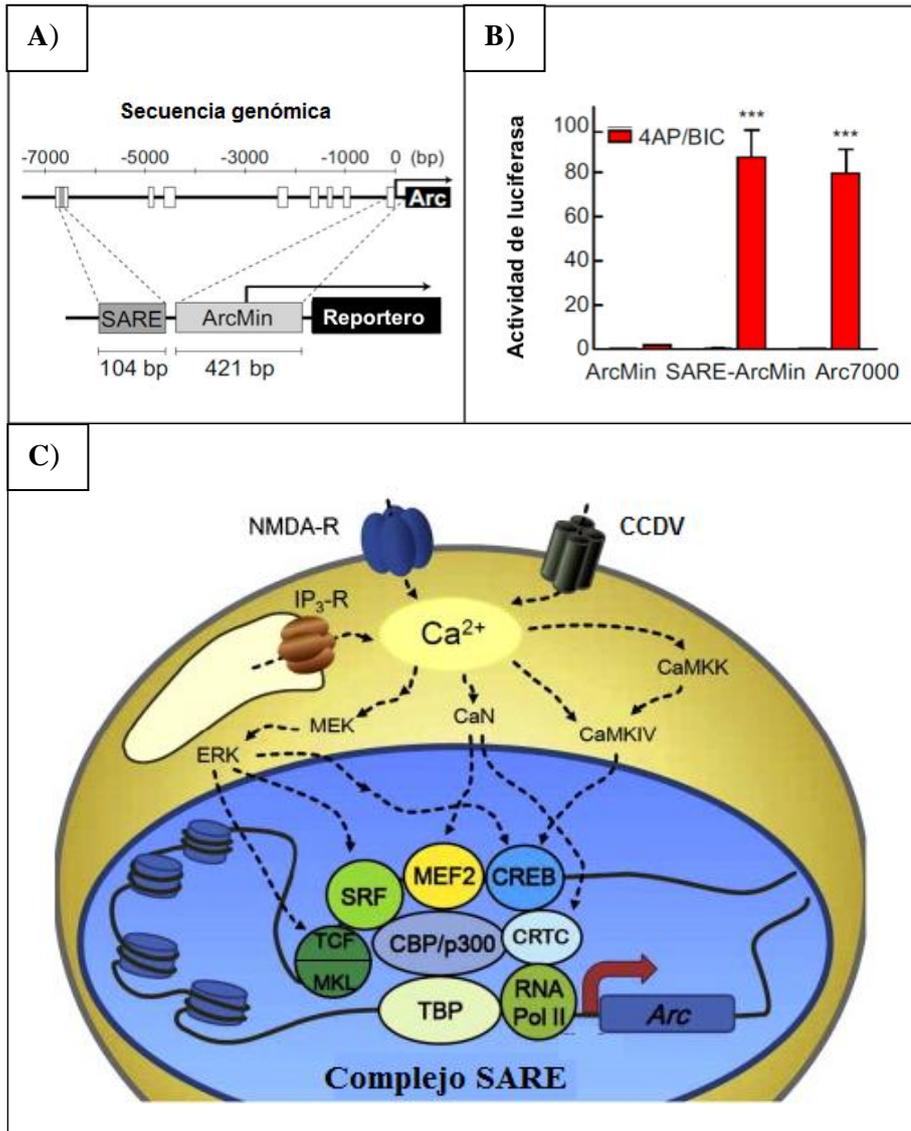
Otro estudio, realizado por Lonergan y colaboradores (2010) exploró los perfiles de expresión de las proteínas Arc y Zif268 en el hipocampo de la rata ante un condicionamiento al miedo. La expresión de ambos genes coincide con la temporalidad de la consolidación de la memoria de condicionamiento al miedo y se relaciona con la plasticidad neuronal durante la formación de esta memoria. Sin embargo, la expresión de la proteína Arc parece ser controlada por la exploración del contexto, mientras que la expresión de Zif268 parece estar más relacionada al aprendizaje asociativo. Esto debido a que tanto el entrenamiento como la exposición a la cámara de entrenamiento indujeron niveles similares de la proteína Arc, lo que sugiere que corresponde al procesamiento del contexto; en contraste la proteína Zif268 se sobreexpresó únicamente en los animales entrenados, lo que sugiere que en el hipocampo esta proteína se relaciona específicamente con la formación de memorias aversivas (Lonergan et al., 2010).

Aunado a esto, en un estudio previo Guzowski y colaboradores (2001) reportaron que la expresión del gen *Arc/Arg3.1* difería de la expresión de *c-Fos* y *Zif268* en primer lugar porque los niveles de ARN mensajero de *Arc/Arg3.1* en el hipocampo correlacionaban con el aprendizaje de una tarea espacial dependiente de hipocampo, pero no en una tarea independiente de hipocampo; y en segundo lugar porque los niveles de mensajero de *Arc/Arg3.1* en el hipocampo y la corteza entorrinal incrementaron después de una tarea de reversión de aprendizaje en comparación a un grupo de animales con desempeño asintótico. Se concluyó entonces que a pesar de que la expresión de estos tres genes era similar en varios aspectos, *Arc/Arg3.1* tenía un patrón de expresión que era más responsivo a las diferencias en las demandas de las tareas conductuales, y por lo tanto su expresión resulta el mejor marcador de actividad neuronal.

## 2.4 El promotor mínimo de *Arc/Arg3.1*

Resulta sumamente importante considerar las características de los promotores que le confieren las características distintivas a los IEGs, para utilizar su inducción como indicador de actividad neuronal. Es por ello que Okuno y colaboradores (Kawashima et al., 2009) en el grupo del Dr. H. Bitó en la Universidad de Tokyo caracterizaron la secuencia del promotor y potenciador mínimo para replicar la actividad del promotor endógeno del gen *Arc/Arg3.1*. En este trabajo localizaron una caja conservada alrededor de 7,000 bases río arriba del inicio de transcripción (ver figura 3-A), el cual contiene elementos de unión a las proteínas CREB, SRF (por sus siglas en inglés: ‘Serum Response Factor’), y MEF2 (por sus siglas en inglés: ‘Myocyte Enhancer Factor-2’) (ver figura 3-C). A dicha secuencia, de aproximadamente 100 nucleótidos le denominaron ‘SARE’, (por sus siglas en inglés: ‘Synaptic Activity Responsive Element’). Los autores proponen que la secuencia SARE unida al promotor proximal de *Arc/Arg3.1* (de aproximadamente 400 nucleótidos río arriba del inicio de transcripción) son suficientes para conferir la expresión característica de *Arc/Arg3.1* que responde a la actividad neuronal de alta frecuencia.

Mediante deleciones selectivas determinaron que de entre varias secuencias conservadas, la caja denominada SARE localizada 7,000 pb río arriba del inicio de transcripción es la secuencia potenciadora que confiere el patrón de expresión que caracteriza al gen *Arc/Arg3.1* en neuronas corticales. Dicha afirmación fue confirmada tanto con la estimulación eléctrica (10 trenes de 100 pulsos a 100 Hz), como con la aplicación de una mezcla de 4-aminopiridina (4AP) y Bicuculina (BIC) durante 4 hrs en cultivos de neuronas primarias transfectadas con un constructo reportero. El efecto activador de la mezcla de 4AP con BIC (4AP/BIC) resulta de que la 4AP bloquea selectivamente canales de potasio activados por voltaje, lo que impide que las neuronas despolarizadas se re-polaricen ya que las cargas positivas del potasio no salen de la célula; mientras que la BIC sobreactiva a las neuronas al bloquear la actividad inhibitoria de los receptores ionotrópicos GABA<sub>A</sub>.



**Figura 3.-** Figuras modificadas de Kawashima et. al., 2009 y Okuno, 2011. **A)** Se ilustra la localización en el genoma de ratón (-7000 pb) de la caja conservada (SARE) identificada como el potenciador primordial que confiere el patrón de expresión al gen *Arc/Arg3.1*; la del promotor proximal (ArcMin) abarcando 421 pb río arriba del inicio de transcripción; y la configuración de un vector en el que se fusionaron ambas secuencias reguladoras para controlar la transcripción de un gen reportero. **B)** Después de estimular con 4-aminopiridina/Bicuculina(BIC) se mide la actividad de la luciferasa en neuronas transfectadas con un vector codificando para luciferasa bajo el promotor ArcMin, ó SARE-ArcMin ó bien el promotor completo ('Arc7000'). Demuestra que el promotor mínimo SARE-ArcMin recapitula la expresión conferida por el promotor completo ('Arc7000'), y ambas son significativamente mayores a la actividad conferida por el promotor proximal ('ArcMin') con un p-val de 0.001. **C)** Mecanismo putativo de la inducción de la expresión de *Arc/Arg3.1* por actividad sináptica. Ante actividad sináptica, los receptores NMDA (NMDA-R), los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) y los receptores IP3 (IP3-R) contribuyen al incremento en el Ca<sup>2+</sup>

intracelular. Éste inicia varias cascadas de señalización de cinasas y fosfatasa, como la ERK, CaN, CaMKIV y CaMKK. La señalización sináptica converge en el elemento potenciador distal SARE, al reclutar un complejo que consiste en los factores de transcripción dependientes de actividad CREB, MEF2 y SRF, así como sus coactivadores TCF, MKL, CBP, p300 y CRTC. Este complejo transcripcional recluta al complejo de pre-iniciación próximo al sitio de inicio de transcripción (flecha roja) e inicia la transcripción de *Arc*. *Arc*, proteína del citoesqueleto regulada por actividad; CaN, calcineurina/PP2B; CaMKIV y CaMKK, cinasas dependiente de  $Ca^{2+}$ /calmodulina IV y II; CBP, proteína de unión a CREB; CREB, proteína de unión al elemento responsivo a AMP cíclico; CRTC, co-activador de transcripción regulado por CREB; ERK, cinasa regulada extracelularmente; MEF2, factor 2 potenciador de miocitos; MEK, proteína activada por mitógenos; MKL, leucemia megakarioblástica; SARE, elemento responsivo a actividad sináptica; SRF, elemento responsivo al suero; TCF, factor del complejo ternario.

En el constructo mencionado (SARE-ArcMin) se fusionaron las secuencias reguladoras de SARE y la del promotor proximal localizado alrededor de 400 pb río arriba del sitio de inicio de transcripción (ArcMin), para controlar la transcripción del gen reportero Luciferasa. A juzgar por la luminiscencia resultado de la actividad de la Luciferasa, se observó que ante el estímulo con 4AP/BIC el promotor SARE-ArcMin promueve la transcripción de luciferasa en una proporción similar al promotor completo de *Arc/Arg3.1* (Arc7000), mientras que el promotor proximal ArcMin prácticamente no presenta transcripción (ver figura 3-B). En conclusión, se demostró que la secuencia SARE-ArcMin (500 pb) es suficiente para regular la expresión de un transgen y hacer que su expresión recapitule el patrón de expresión conferido por el promotor completo (7000 pb) en cultivos de neuronas corticales (Kawashima et al., 2009).

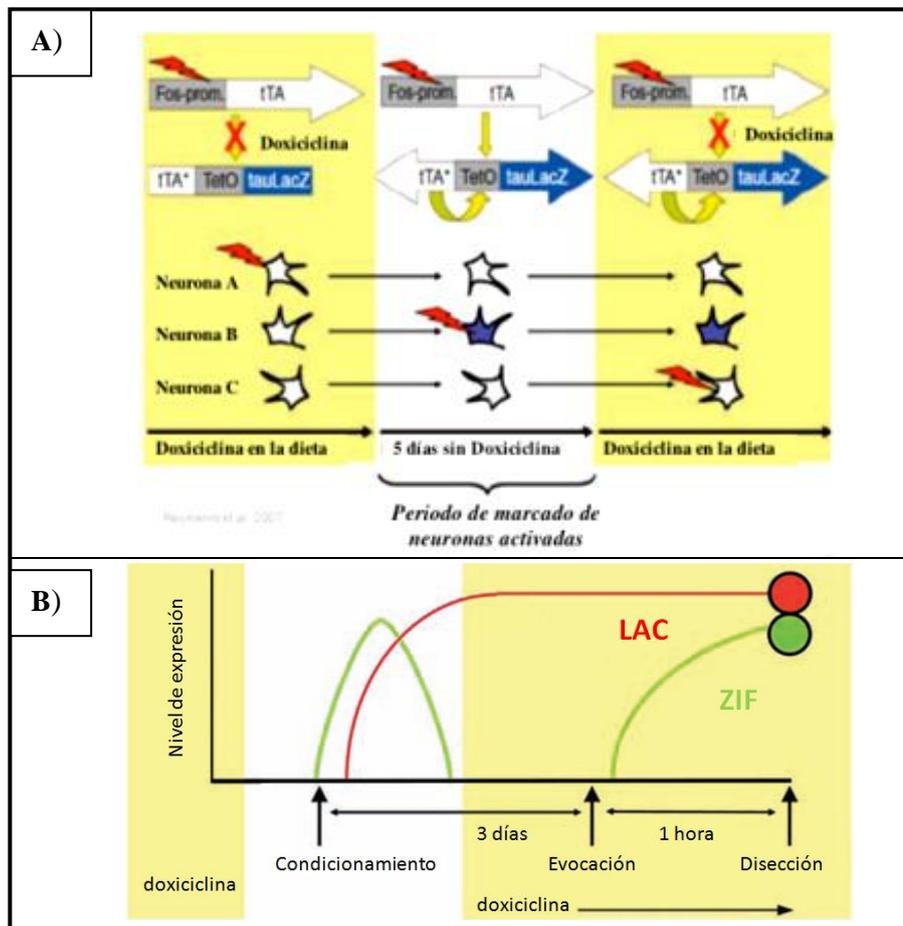
### **3. ANTECEDENTES**

#### **3.1 El ratón 'Tet-Tag'**

Una contribución al entendimiento de cómo ocurre la codificación neuronal que permite almacenar memorias a largo plazo fue hecha por Reijmers y colaboradores (2007), quienes crearon un ratón transgénico llamado 'Tet-Tag mouse'. Dicha herramienta transgénica ejemplifica las ventajas del uso de los IEGs como reporteros de actividad neuronal, ya que permitió comparar los ensambles que representan redes relacionadas a diferentes tareas conductuales separadas ampliamente en el tiempo, analizando con resolución celular las neuronas activadas en todo el cerebro del mismo sujeto vivo y prácticamente intacto.

Este ratón transgénico utiliza el sistema inducido por Tetraciclina (Tet) para marcar a las neuronas que expresan el IEG *C-fos* cuando se retira la administración oral de Doxiciclina (Dox), un análogo del antibiótico Tet. Gracias a la estructura del diseño, se confía en que el promotor del *C-Fos* traducirá la actividad neuronal a la transcripción del gen del transactivador de Tetraciclina (tTA), y que un promotor bidireccional conteniendo las secuencias operadoras reconocidas por las moléculas de la proteína tTA retroalimentará positivamente la expresión del gen *LacZ* únicamente en la ausencia de Dox en la célula. De esta manera el marcado neuronal se origina solamente durante un periodo temporalmente restringido, y además es permanente. Por otro lado, utilizan la expresión del IEG *Zif268* (o *Egr1*) como indicador de actividad neuronal reciente, que permite identificar a las neuronas activadas durante la evocación, y las comparan con las neuronas que se activaron durante la adquisición.

El protocolo experimental que utilizaron Reijmers y colaboradores (2007), consistió en mantener a los ratones transgénicos bajo una dieta de comida conteniendo 40mg/kg de Dox durante más de 7 semanas. Para comenzar el experimento, se separaron los ratones en cajas individuales y se suspendió la administración de Dox en la comida durante 3 a 5 días, tiempo después del cual se realizó el condicionamiento al miedo. El condicionamiento se realizó en 3 sesiones espaciadas por 3 horas. En cada sesión se colocó al animal en una cámara cuadrada con aroma a limón, y a los 180 seg, 260 seg, 340 seg, y 420 seg se sonó un tono de 20 seg de duración, 85 dB, y 2800 Hz, el cual terminaba simultáneamente con un choque eléctrico (2s, 0.75 mA) en las patas del animal.



**Figura 4.-** Figura modificada de Reijmers et al. (2007). **A)** Se muestra el sistema responsivo a tetraciclina implementado en el ratón Tet-Tag. La ventana temporal para marcar neuronas se inicia al someter al animal a una dieta sin Doxiciclina (Dox), representada por el bloque blanco intermedio. La activación neuronal activa el ciclo retroalimentado de activación transcripcional y comienza la expresión tanto del marcador tau-LacZ como de una versión del transactivador de tetraciclina (tTA\*) insensible a la droga. La ventana de marcado se termina al regresar al ratón a una dieta conteniendo Dox, ya que se bloquea nueva activación del promotor bidireccional TetO. Sin embargo, las neuronas activadas previamente continúan expresando el marcador gracias al bucle retroalimentado por tTA\*. **B)** Protocolo diseñado para detectar la reactivación de las neuronas involucradas en el aprendizaje y la evocación del miedo condicionado. El condicionamiento origina la expresión de genes de expresión inmediata temprana, incluyendo a *C-fos* y *Zif268*; y dado que se lleva a cabo durante la ausencia de Dox, se induce también la expresión a largo plazo de *Lac-z*. La evocación se efectúa 3 días después del aprendizaje y en presencia de Dox, lo que previene subsecuente activación del bucle retroalimentado que generaría la expresión constitutiva de *LacZ*. Una hora después de la evocación, se disectó el cerebro para utilizar a las proteínas codificadas por *LacZ* (LAC) y *Zif268* (ZIF) como indicadores de actividad neuronal en dos tiempos distintos.

Al final del día del condicionamiento, se sometió a los ratones a una dieta con 1g/kg de Dox para bloquear subsecuente activación del bucle retroalimentado. Se realizó una sesión de evocación 3 días después del aprendizaje con una sesión de 500 seg idéntica a las de condicionamiento con la excepción de que no se administraron descargas eléctricas. Los cerebros se extrajeron 1 hora después de la evocación y posteriormente se procesaron para identificar las proteínas del gen reportero *LacZ* y de *Zif268* con anticuerpos específicos.

De esa manera, compararon a las neuronas que se activan durante el aprendizaje de la tarea del condicionamiento al miedo (neuronas positivas para la  $\beta$ -Galactosidasa, codificada por el gen *LacZ*), con aquellas neuronas que se activan durante la re-exposición al contexto (neuronas positivas para *Zif268*). Los resultados del conteo de células positivas para ambos anticuerpos mostraron que un subgrupo de neuronas en la amígdala basolateral que son reclutadas durante la experiencia, se reactivan durante el recuerdo (12%). Esta evidencia es de gran importancia porque demuestra parcialmente que la noción fundamental del postulado Hebbiano - donde se sugiere que los ensambles neuronales formados durante la adquisición de nueva información son los responsables de su recuerdo - es válida (Hebb, 1949; Reijmers et al., 2007). Sin embargo, el 12% que reportan resulta considerablemente menor en comparación con otros datos de la evocación de la memoria.

En primera instancia, usando catFISH combinado con inmunohistoquímica, Ramírez-Amaya y colaboradores (2005) reportaron una reactivación del 83% en las neuronas de la corteza parietal ante la re-exposición a un ambiente que las ratas habían explorado 1 hr antes. Por otro lado, registros electrofisiológicos de CA1 y del Giro Dentado en el hipocampo muestran que de 115 células principales registradas como activas durante sesiones de forrajeo de ratas, el 27% mantuvo un disparo específico al ambiente familiar (Nitz y McNaughton, 2004). Además, en el caso de la amígdala lateral mediante catFISH con *Arc/Arg3.1* se ha mostrado que existe una reactivación neuronal del 65% ante la re-exposición al mismo ambiente (25 min de espaciamiento) donde se condicionó previamente (1 ó 2 días) al ratón con una descarga eléctrica en las patas (Hashikawa et al., 2011).

Si bien los estudios mencionados tratan de una memoria reciente, mientras que los resultados de Reijmers y colaboradores (2007) se refieren a la memoria de largo plazo (evaluada 3 días después de haberse dado el aprendizaje), no se puede asegurar que la menor proporción de reactivación se deba únicamente a que la dinámica de los ensambles que codifican estos distintos tipos de memoria sean distintos, sino que salta a la vista la posibilidad de que se esté sub-estimando el porcentaje de reactivación al no poder discriminar correctamente en un inicio a las neuronas específicamente involucradas en el aprendizaje.

Esto evidencia la falta de precisión del sistema diseñado por Reijmers para relacionar a las neuronas marcadas específicamente con la asociación durante el periodo de

condicionamiento. De manera que el porcentaje propuesto por dichos autores podría estar subestimando el porcentaje de reactivación que realmente se lleva a cabo cuando el animal evoca una memoria. Este problema se debe a la lenta dinámica de regulación que utiliza dicho sistema de marcado de actividad neuronal, en el cual, el periodo marcado es de más de 12 horas; el ratón ‘Tet-Tag’ necesita interrumpir la dieta con Dox entre 4 y 5 días antes del condicionamiento para asegurar la unión de la proteína tTA al promotor bidireccional, un periodo durante el cual resulta incierto el momento en el que comienzan a expresar *LacZ* las neuronas activadas. Ello provoca que no se pueda relacionar de manera confiable cuáles unidades neuronales se relacionan únicamente con la asociación del estímulo incondicionado con el condicionado, y consecuentemente, el porcentaje de reactivación podría estar subestimado.

Es importante mencionar también que aún si la herramienta transgénica desarrollada por Reijmers y colaboradores (2007) no subestimase el porcentaje de reactivación neuronal, su dinámica de regulación no permite distinguir cuáles elementos de una tarea conductual resultan salientes y pasan a formar parte de la memoria de largo plazo. De la misma manera, los límites que representan el largo tiempo de disponibilidad de este sistema no permiten estudiar apropiadamente la activación neuronal que subyace a etapas de la formación de la memoria circunscritas temporalmente (como la reactivación fuera de línea). Es por ello que hemos propuesto implementar un nuevo diseño para un sistema inducible que presenta varias ventajas sobre las capacidades de estudio que provee el ratón ‘Tet-Tag’ antes mencionado.

### 3.2 Diseño previo del sistema de regulación

A manera de tesina de licenciatura (Rangel-Guerrero, 2010), se propuso un sistema de regulación génica diseñado para marcar permanentemente a las neuronas activadas durante un rango temporal bastante más reducido que el utilizado en el ratón ‘Tet-tag’ (Reijmers et al., 2007), y así poder estudiar con mayor resolución los mecanismos para la formación de la memoria de largo plazo.

Dicho sistema utilizó como base el ‘Regulated Mammalian Expression System’ (Zhao et al., 2003) comercializado por la compañía Promega (Cat: C9470) ya que ofrece un control relativamente rápido para el “encendido” y “apagado” de la expresión de un transgen y está adaptado para la regulación de la expresión en mamíferos *in vivo*. El sistema base consta de dos plásmidos codificando para una proteína quimérica que interactúa con dos coumarinas (Coumermicina-A1 y Novobiocina) y actúa como factor de transcripción, así como para el transgen regulado (ver figura 5). Siendo sus elementos de origen procariótico, el implementar este sistema en un animal transgénico no debería interferir con la regulación de las funciones endógenas del organismo.

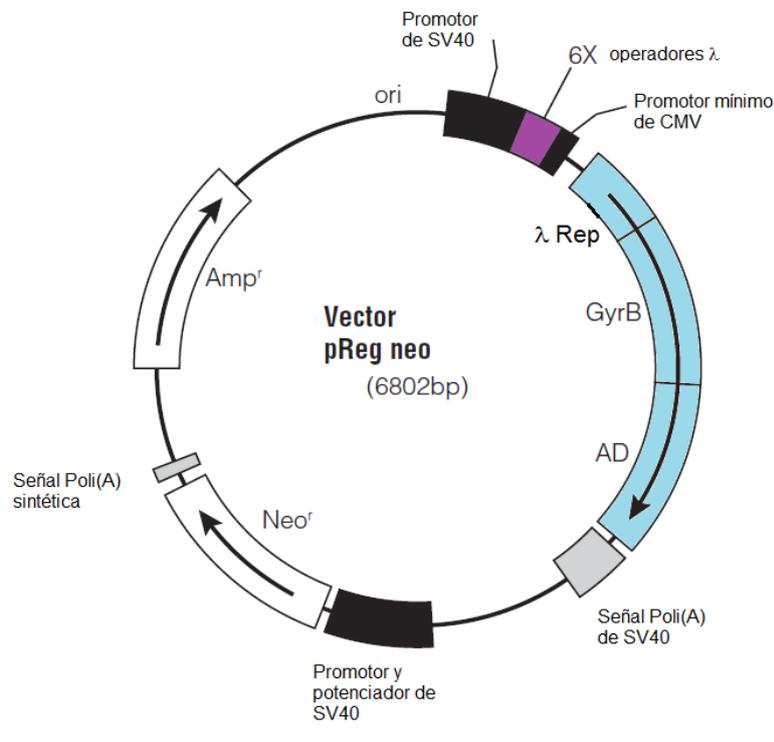
En particular, la proteína quimérica transactivadora (que se denominará en el presente trabajo como ‘LGA’) codificada uno de los dos plásmidos denominado ‘pReg neo’ es el elemento crucial del sistema de regulación génica, y está compuesta por tres dominios:

1) Dominio de unión a ADN: proviene del dominio N-terminal del represor (gen CI) del bacteriófago Lambda ( $\lambda$ ). Esta secuencia, denominada ‘ $\lambda$ Rep’, que consta de los residuos 1-92 y 132-236 (Pabo et al., 1979), requiere de su dimerización - controlada por el dominio C-terminal en la proteína original del fago  $\lambda$  (Burz et al., 1994)- para unirse al ADN. Sin embargo, dado que el dominio N-terminal puede mantener una débil dimerización, se ha mutado esta secuencia para disminuir la expresión basal (Zhao et al., 2003). El objetivo de este dominio es dirigir a la proteína quimérica hacia sus sitios responsivos localizados en el promotor del transgen regulado y en el promotor de la propia LGA.

2) Dominio N-terminal de la girasa-B bacteriana (GyrB): una parte del dominio N-terminal de esta girasa (aminoácidos 2-220) fue fusionada con el dominio del represor para conferir a la proteína quimérica completa la facultad de interactuar con las coumarinas reguladoras. La Coumermicina-A1 tiene una afinidad 1:2 con esta secuencia de aminoácidos,

y por lo tanto promueve la formación de homodímeros. Mientras que la Novobiocina tiene una afinidad 1:1 y quebranta los dímeros al formar monómeros (Ali et al., 1993).

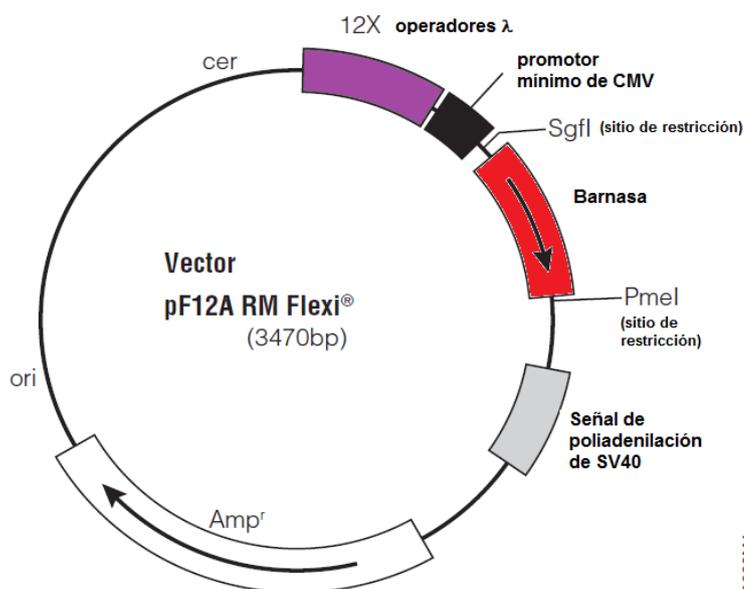
3) Dominio de activación transcripcional: se refiere a la secuencia del gen RELA que codifica para el dominio C-terminal de la proteína NF-kappaB(NFκB)-p65 del complejo transcripcional NFκB, y que confiere a la proteína completa la facultad de ser un factor de transcripción al ser llevado a un sitio promotor (Schmid et al., 1994).



**Figura 5.-** Figura modificada del Manual del producto C9470 de Promega. Esquema del vector ‘pReg neo’ que codifica para la proteína quimérica transactivadora (en azul) compuesta por sus tres dominios: 1) el dominio de unión al ADN del represor Lambda (‘λRep’), 2) el dominio de la girasa bacteriana para la interacción con los antibióticos reguladores (‘GyrB’), y 3) el dominio de activación transcripcional del NFκB-p65 (‘AD’). El promotor de esta proteína quimérica se compone del promotor temprano del virus SV40, 6 copias en tándem del sitio responsivo al represor λ (en morado), y un promotor mínimo de citomegalovirus (CMV).

A su vez, el promotor de este plásmido está compuesto por el promotor temprano del virus SV40, 6 copias en tándem del sitio responsivo al represor λ (operadores λ) y un promotor mínimo de citomegalovirus (CMV). Los operadores λ permiten una auto-inducción de LGA ante la interacción con Coumermicina para tener un efecto de contraste entre la expresión basal y el “encendido” del sistema de regulación.

El segundo plásmido es el ‘pF12A RM Flexi’ (ver figura 6) que codifica para una ribonucleasa letal para las células (Barnasa) y debe ser reemplazada por la secuencia del gen que se desea expresar ante la inducción con Coumermicina. Este gen se transcribirá entonces bajo la actividad de un promotor responsivo a los dímeros de la proteína LGA codificada en el otro plásmido, debido a la presencia de 12 operadores  $\lambda$  en tándem río arriba de un promotor mínimo de citomegalovirus.

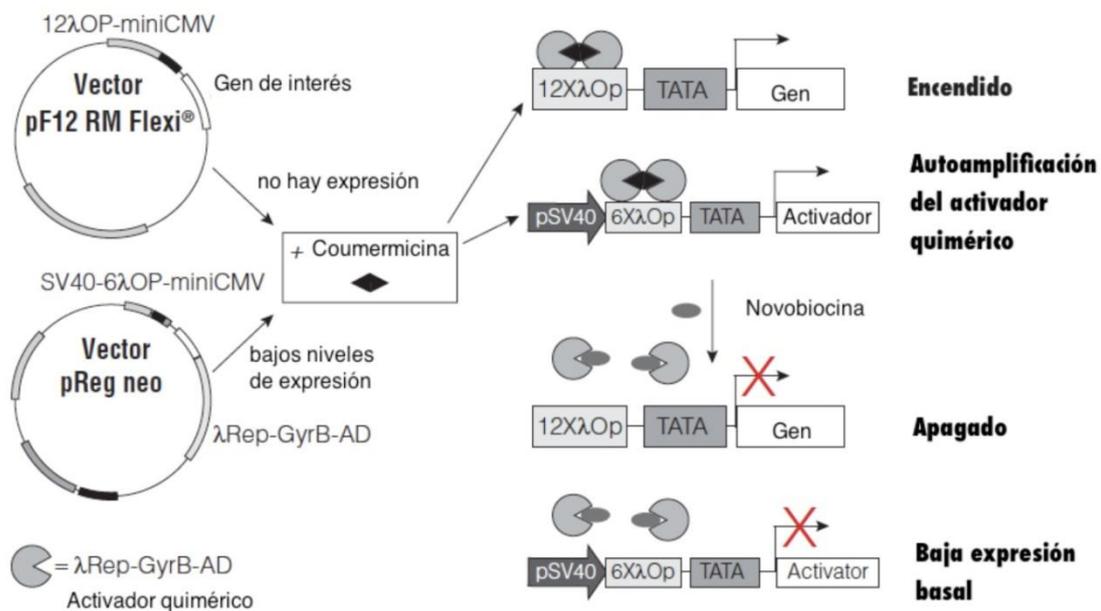


**Figura 6.-** Figura modificada del Manual del producto C9470 de Promega. Esquema del vector ‘pF12A RM Flexi’ que está diseñado para introducir el gen de interés reemplazando el gen que codifica para la proteína letal Barnasa (en rojo). La regulación del transgen sería dada por el promotor mínimo de citomegalovirus (CMV) y 12 secuencias en tándem de operadores  $\lambda$  (en morado) que atraerían a la proteína quimérica transactivadora dimerizada por Coumermicina.

El ‘Regulated Mammalian Expression System’ en su totalidad (ver figura 7) ofrece altos niveles de inducción dosis-dependientes y bajos niveles de inducción basal. Una especie de interruptor entre los estados “encendido” y “apagado” del sistema se logra con la interacción de los antibióticos moduladores (Coumermicina y Novobiocina). La activación de la transcripción del gen regulado depende de la presencia de Coumermicina en la célula para que dimerize al factor de transcripción LGA mediante la interacción con su dominio GyrB y de esta forma el dominio  $\lambda$ Rep funciona para dirigir la proteína a los promotores que contienen los sitios responsivos, y una vez en proximidad, el dominio NF $\kappa$ B induce la

transcripción. Mientras que el apagado depende de la presencia de Novobiocina para que quebrante los dímeros y prevenga la actividad del factor de transcripción LGA (Zhao et al., 2003).

La Coumermicina es necesaria para inducir eficientemente al sistema en cultivos de células de mamífero como HEK293, HeLa y COS-7 y la concentración de esta debe estar en el rango de 0.5 y 10 nM. Mientras que la Novobiocina frena la transcripción en concentraciones 1000 veces mayores que la Coumermicina. En general, una concentración de 5 nM de Coumermicina y de 2.5  $\mu$ M de Novobiocina han funcionado bien para “encender” y “apagar” el sistema respectivamente (Manual de producto C9470 de Promega).



**Figura 7.-** Figura modificada del Manual del producto C9470 de Promega. Esquema del ‘Regulated Mammalian Expression System’ compuesto por dos vectores que codifican para el gen regulado y la proteína quimérica transactivadora (λRep-GyrB-AD), la cual tiene una afinidad 2:1 con las moléculas de Coumermicina-A1 (rombos) y 1:1 con las moléculas de Novobiocina (óvalos). Se aprecia el estado “encendido” de la transcripción del gen regulado y de la propia λRep-GyrB-AD ante la presencia de Coumermicina-A1; y el estado de “apagado” ante la presencia de Novobiocina que evita la transcripción del gen regulado y disminuye a los niveles basales la transcripción de λRep-GyrB-AD.

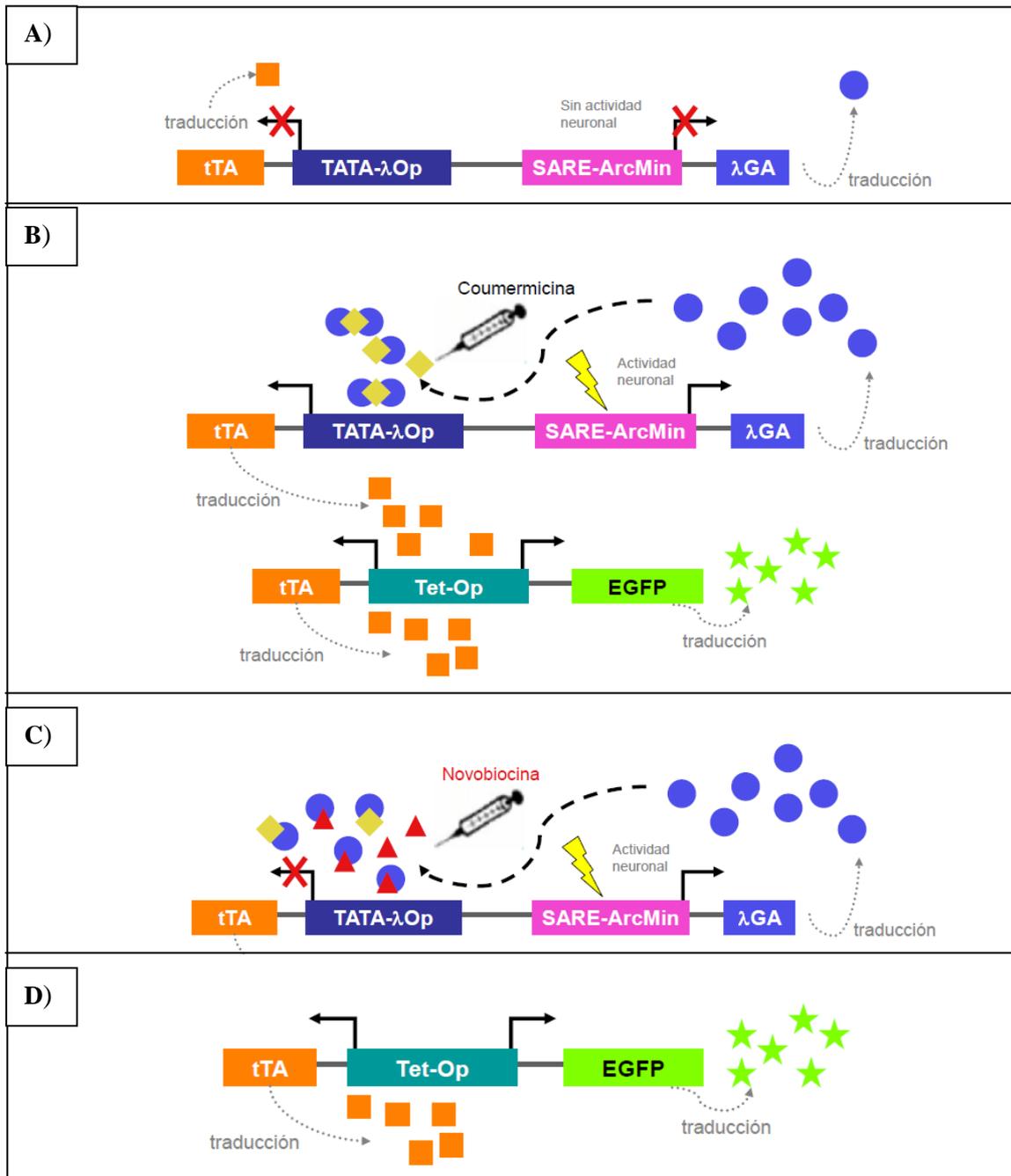
Para elaborar un sistema de regulación génica que marcarse permanentemente a las neuronas activadas durante cierta ventana temporal, se propuso fusionar dicho sistema base de

Promega con el sistema inducido por Tetraciclina (Gossen y Bujard, 1992) en la configuración utilizada por Reijmers y colaboradores (2007) y utilizar el promotor mínimo de *Arc/Arg3.1* (Kawashima et al., 2009) como indicador de la actividad neuronal en lugar del promotor de *C-Fos* utilizado por los autores mencionados debido a que se considera el mejor candidato. Para el sistema de regulación génica propuesto, la proteína LGA y el gen regulado son codificados por un mismo plásmido, donde el gen regulado es el transactivador de tetraciclina (tTA).

Dado que la versión del sistema de tetraciclina utilizado por Reijmers y colaboradores (2007) es la denominada ‘Tet-off’, el transactivador funge como factor transcripcional sin necesidad de añadir Doxyciclina y en el sistema propuesto promueve la transcripción tanto de la proteína verde fluorescente (EGFP por sus siglas en inglés: ‘Enhanced Green Fluorescent Protein’) como de la proteína tTA mediante un promotor bidireccional conteniendo los sitios responsivos al tTA codificados en otro plásmido.

Otra característica importante del sistema propuesto para restringir el tiempo durante el cual se induce el marcado neuronal es la degradación de la proteína LGA. Dependiendo del tiempo de vida media de LGA (no reportado), las neuronas que se hayan activado esa cantidad de tiempo antes de la llegada de Coumermicina a la célula habrían transcrito LGA y estas moléculas estarían listas para interactuar con el antibiótico y por lo tanto inducir el marcado neuronal. Sin embargo, el propósito es identificar a las neuronas activadas en el lapso más corto posible a partir de la administración intracerebroventricular e Coumermicina, por lo que se propone reducir la vida media de LGA al máximo.

La vida media de una proteína se puede modular a voluntad utilizando la técnica de fusión de Ubiquitina (Varshavsky, 1996) que explota la acción de las deubiquitininas de eucariotes para cortar co-traduccionalmente una Ubiquitina de la proteína deseada a la que se fusionó su secuencia. De esta manera se modifica el amino terminal de la proteína, el cual se debe encontrar dentro de unidades denominadas ‘N-degrones’ que están diseñadas para ser reconocidas por el proteosoma 26S y conferir distintas vidas medias que van desde 5 min hasta horas en células de mamífero (Cadima-Couto et al., 2009).

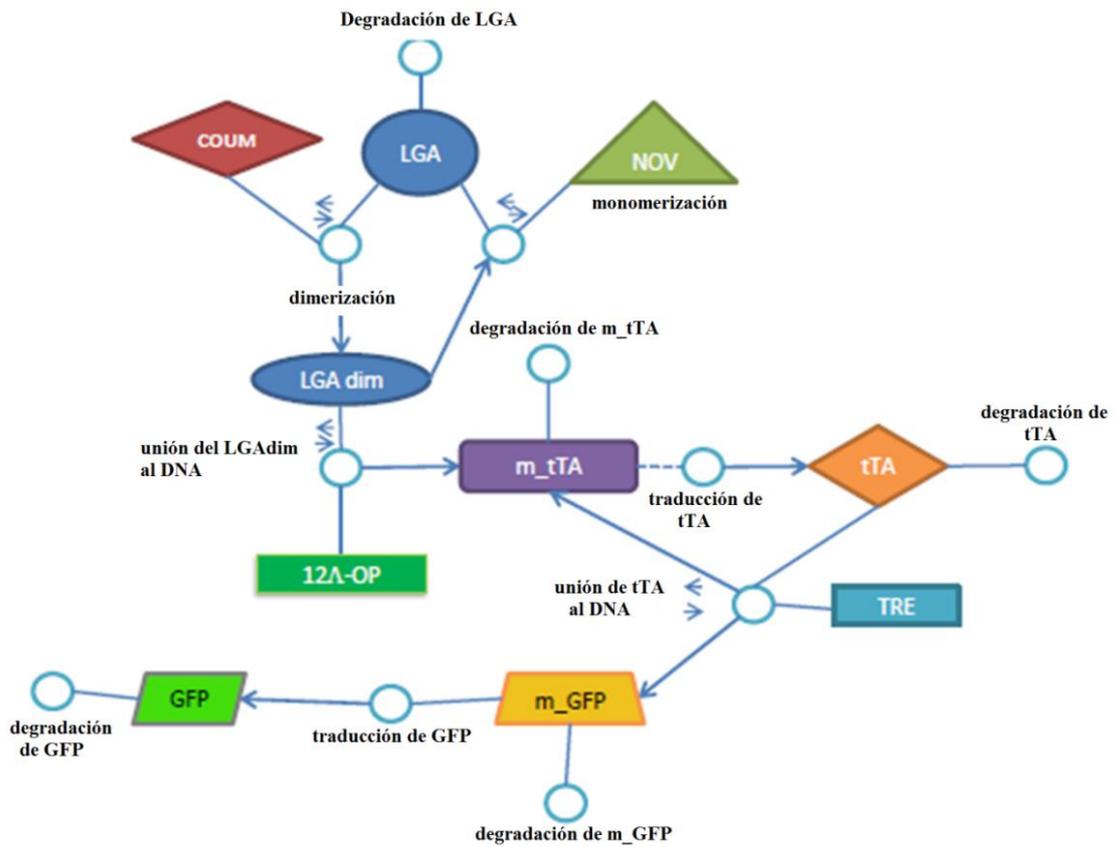


**Figura 8.-** Esquema del sistema final propuesto. **A)** En una neurona inactiva se esperarían únicamente bajos niveles de transcripción basal y poca traducción de la proteína quimérica transactivadora LGA ( $\lambda$ GA: círculos azules) y del transactivador de Tetraciclina (tTA: cuadros naranjas). **B)** Al administrar Coumestrolina y ante actividad neuronal, el promotor mínimo de arc/arg3.1 ('SARE-ArcMin') induce la transcripción de  $\lambda$ GA, la cual se dimeriza y actúa como factor de transcripción al unirse a su operador responsivo (TATA- $\lambda$ Op: en azul marino) y así promover la transcripción de la proteína tTA que a su vez se unirá al promotor bidireccional Tet-Op (en azul turquesa) y activará un bucle retroalimentado que expresará el gen codificante de la proteína verde fluorescente (EGFP: estrellas verdes). **C)** Después de administrar el antibiótico Novobiocina, se disocian los dímeros de la proteína quimérica transactivadora y por lo tanto se evita la transcripción de tTA a pesar de que ocurra actividad neuronal. **D)** Una vez que el promotor bidireccional Tet-Op es activado en alguna célula, ésta continuará expresando EGFP sin importar la actividad neuronal o presencia de antibióticos.

Para decidir el tiempo de vida media óptima se tendrá que hacer un escaneo de distintos tiempos de vida media para identificar cual es el mínimo que sigue permitiendo la acumulación suficiente de LGA como para inducir la transcripción de tTA ante la adición de Coumermicina. Así, se espera que únicamente las neuronas activadas durante el periodo de disponibilidad de Coumermicina y ausencia de Novobiocina sean las que comiencen la transcripción de EGFP y se mantendrá su transcripción a partir de entonces gracias al bucle retroalimentado (ver figura 8).

Las concentraciones e interacciones moleculares, tasas de producción y degradación, considerando separadamente los procesos de transcripción y traducción de los componentes del sistema, fueron modeladas con un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias (ver figura 9 y Material Anexo). Los valores de los parámetros cinéticos se basaron en los datos publicados (Kampranis et al., 1999; Tigges et al., 2010; Vidugiriene et al., 2007; Zhao et al., 2003) y se realizó un escaneo para encontrar el valor óptimo de otros. Los resultados de la simulación definieron una ventana mínima de espaciamiento entre la presencia de Coumermicina y la de Novobiocina de 20 min. Sin embargo, tomando en cuenta que los valores reales pueden variar de los aproximados utilizados en este modelo matemático, se considera que el lapso entre el “encendido” y el “apagado” del sistema queda en un rango de un par de horas.

En conclusión, el ‘Regulated Mammalian Expression System’ tiene propiedades únicas que le convierten en el sistema más conveniente para lograr restringir la transcripción de un gen a tiempos relativamente cortos. En el sistema finalmente propuesto se espera que (según la simulación *in silico* del sistema) el “encendido” y “apagado” ante la adición de los antibióticos reguladores vaya del rango de decenas de minutos a un par de horas, y por lo tanto sugiere su viabilidad para los fines mencionados.



**Figura 9.-** Modelo de los procesos moleculares que consideraron para simular la cinética de las interacciones involucradas en el sistema de regulación génica propuesto. Coumestrolina (COUM); proteína λGA (LGA); Novobiocina (NOV); dímero de LGA (LGA dim); transactivador de tetraciclina (tTA); RNA mensajero del tTA (m\_tTA); elemento responsivo al tTA (TRE); proteína verde fluorescente (GFP); RNA mensajero de GFP (m\_GFP); operadores lambda (12λ-OP).

### 3.3 Evaluación piloto del efecto de los antibióticos reguladores

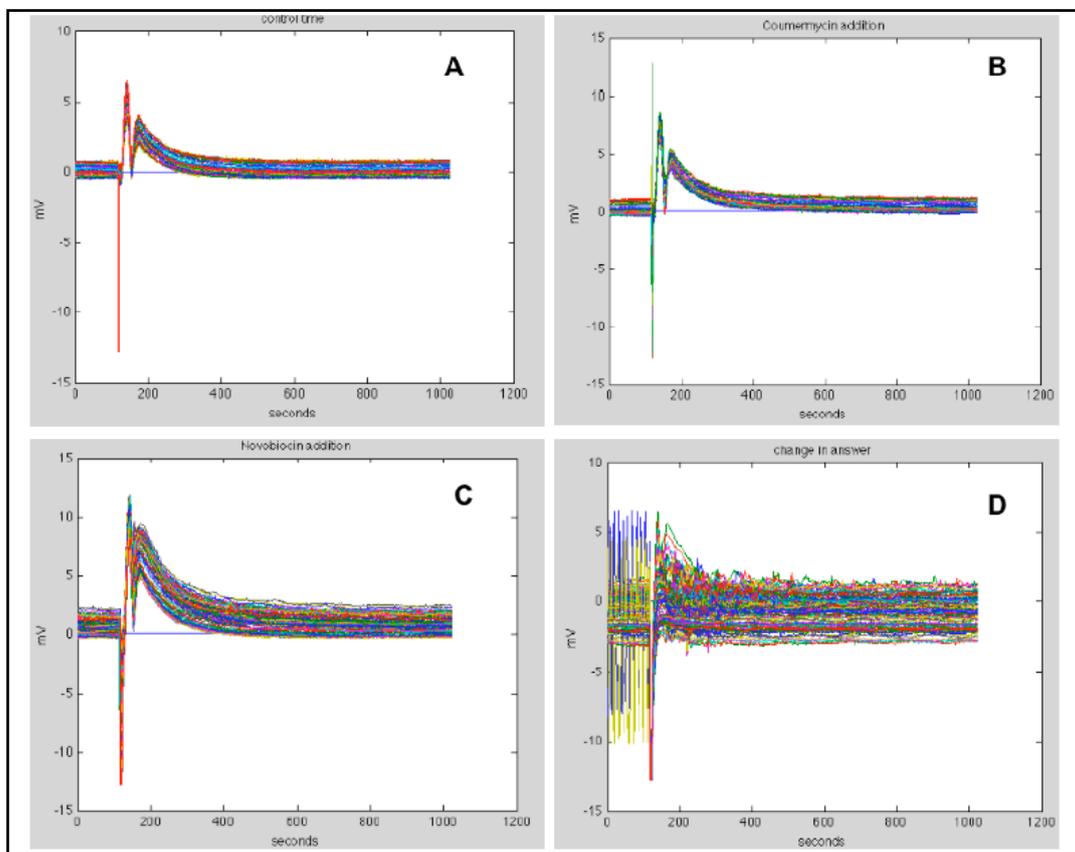
A pesar de que el sistema propuesto presume ser viable para su implementación en células de mamífero al componerse de proteínas bacterianas que carecen de blancos endógenos de mamíferos, se tienen algunos estudios que ponen en duda ese supuesto. Se ha reportado (Fox y Studzinski, 1982) que la actividad de la ATPasa nucleolar en cultivos de células AG2804 (fibroblastos humanos de pulmón) disminuye al tratar con 180 $\mu$ M de Novobiocina y 180  $\mu$ M de Coumermicina-A1 durante 8 hrs. Además, la Novobiocina inhibe la proteína HSP90 que participa en la acumulación de la proteína Akt/PKB en las mitocondrias según lo reportado por Barksdale y Bijur (2009) quienes inyectaron Novobiocina 625  $\mu$ M intracerebroventricularmente en ratones y observaron que los niveles de Akt disminuyeron en mitocondrias corticales.

Sin embargo, estos reportes refieren concentraciones de los antibióticos muy superiores a lo que se requiere para inducir y apagar el sistema en cultivos celulares (5 nM de Coumermicina y 2.5  $\mu$ M de Novobiocina). En este respecto, se ha reportado que ni la tasa de crecimiento celular de células Hek293A (células humanas embrionarias de riñón) ni la expresión de un reportero fluorescente transfectado se alteran ante la adición de Coumermicina 10  $\mu$ M y Novobiocina 25  $\mu$ M y por lo tanto no causan toxicidad celular a estas concentraciones (Zhao et al., 2003).

Por otro lado, cabe destacar que la Coumermicina ya ha sido utilizada como inductor de dimerización de una proteína quimérica (Gyr-PKR) en un ratón transgénico al administrarse tanto intraperitonealmente como en la dieta a una concentración de 0.25 mg/ratón ó 0.5 mg/ratón respectivamente, sin reportarse efectos adversos (Papadakis et al., 2011). Dado que se desea utilizar el sistema para estudiar la actividad de las neuronas en un animal transgénico, es imperante determinar si estos antibióticos tienen ó no un efecto en la actividad neuronal. Debido a que el sistema no ha sido probado aún en líneas neuronales, y que generalmente se requieren concentraciones mayores de los inductores *in vivo* que *in vitro*, se decidió probar los antibióticos en un orden de magnitud por arriba de lo recomendado por Promega para la regulación del sistema *in vitro*.

Con la finalidad de evaluar si los antibióticos reguladores alteran la actividad

neuronal, como parte de la tesina de licenciatura (Rangel-Guerrero, 2010), en el laboratorio del Dr. Rafael Gutiérrez, se realizó un experimento piloto registrando la actividad poblacional del hipocampo en rebanadas de cerebro de ratón. Se añadió Coumermicina al líquido cefaloraquídeo artificial (aCSF, por sus siglas en inglés: ‘artificial Cerebrospinal Fluid’) para alcanzar una concentración final de 5  $\mu\text{M}$  y después de 20 minutos de registro de la actividad basal no observamos ningún efecto o cambio notable. Acto seguido se añadió Novobiocina para alcanzar una concentración de 2.5 mM, y a los 20 min se observó un claro aumento en la actividad y posteriormente actividad paroxística a los 40 min (ver figura 10).



**Figura 10.-** Registros electrofisiológicos de la actividad poblacional de CA1 en distintas condiciones. **A)** Trazo de los 20 min de tiempo control. **B)** Trazo de los 20 min con Coumermicina-A1 5 $\mu\text{M}$  en el aCSF circulante (no se observan cambios en la actividad). **C)** Trazo de los primeros 20 min con Novobiocina 2.5 mM (se observa un notable cambio en la actividad). **D)** Trazo de los últimos 20 min con 2.5 mM (se observa actividad paroxística). En el eje de las ordenadas se indica el voltaje (mV). En el eje de las abscisas se observa el tiempo (segundos) de registro.

De este experimento se concluyó que dicha concentración de Coumermicina, un orden de magnitud por arriba de lo recomendado, resulta segura para utilizarse para inducir el sistema cerebro de ratón, mientras que la concentración utilizada de Novobiocina podría ser inviable y por lo tanto se requerían más pruebas para evaluar un rango de concentraciones que pudiera ser utilizada para nuestro propósito, y en el cual no se alterara la actividad neuronal.

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

Los resultados de Reijmers y colaboradores (2007) muestran que las neuronas localizadas en la amígdala basolateral que responden durante la evocación de la memoria son un subgrupo de las neuronas que se activaron durante la adquisición. Sin embargo, el 12% que reportan resulta considerablemente menor en comparación con otros datos de la evocación de la memoria. Además, la ventana de marcado abarca decenas de horas, y por lo tanto no permite discernir qué eventos discretos de una tarea conductual persisten en la memoria de largo plazo, ni tampoco estudiar eventos del proceso de formación de la memoria que son circunscritos temporalmente como la reactivación fuera de línea. Es por ello que se requiere de una herramienta con mejor resolución celular para resolver los requerimientos temporales del marcado de las neuronas activadas.

Para ello, en primera instancia proponemos utilizar la regulación del promotor mínimo del IEG *Arc/Arg3.1* como indicador de actividad neuronal en lugar del promotor de *c-Fos*, debido a que el patrón de expresión de *Arc/Arg3.1* es altamente dinámico y se induce específicamente ante tareas de exploración y condicionamiento, siendo más responsivo a las diferencias en las demandas de las tareas conductuales (Barnes et al., 1990; Guzowski et al., 2001, 2004, 2006; McNaughton et al., 1994; Miyashita et al., 2008; Okuno, 2011; Qin et al., 1997).

En segundo lugar, se propone delimitar la ventana de marcado de la actividad neuronal al mínimo tiempo posible, utilizando un sistema (el ‘Regulated Mammalian Expression System’ comercializado por Promega) que induce la expresión génica ante la presencia de un antibiótico (Coumermicina), y la reprime en presencia de otro (Novobiocina). El diseño fue propuesto como parte de una tesina de Licenciatura (Rangel-Guerrero, 2010) y se sugirió su viabilidad para los fines mencionados. Esto representará una ventaja definitiva con respecto al trabajo de Reijmers y colaboradores (2007) debido a que, a pesar de ser el sistema de regulación génica más ampliamente utilizado, el ‘Tet-system’ (Gossen y Bujard, 1992) no cuenta con un antagonista que eficientemente frene la acción del tTA.

En tercer lugar, otra ventaja de nuestra propuesta con respecto al ratón ‘Tet-Tag’ es el uso de un marcador fluorescente como reportero de la actividad neuronal remota, ya que al

cruzarse el ratón transgénico con una línea de ratones transgénicos ya disponible en el laboratorio (proporcionada por el Dr. Okuno y el Dr. Bito de la Universidad de Tokyo), los cuales expresan la proteína amarillo fluorescente directamente bajo el promotor de *Arc/Arg3.1* (que funcionará como indicador de actividad neuronal reciente), se evitará la necesidad de procedimientos histológicos e inmunohistoquímicos. Aún más, se permitirá la evaluación *in vivo* de la actividad neuronal en el cerebro del ratón mediante la implementación de microscopía confocal.

El presente trabajo propone entonces concluir la evaluación de los antibióticos reguladores para decidir la viabilidad del sistema de regulación que se pretende utilizar, así como comenzar la construcción del sistema de vectores que conforman el sistema propuesto.

## **5. HIPÓTESIS**

El sistema propuesto será una herramienta viable que nos permitirá identificar a las neuronas activadas durante una delimitada ventana temporal ante la estimulación sensorial o conductual. En particular:

1.- La concentración de 2.5 mM de Novobiocina que se requiere para apagar el marcado de neuronas activas al frenar la transcripción in vitro del sistema, no afectará la actividad neuronal y por lo tanto será viable utilizar este sistema de inducción en ratones transgénicos.

2.- Se logrará la construcción del promotor mínimo del gen *Arc/Arg3.1* con base en el reporte del Kawashima y colaboradores (2009), para regular la transcripción de la EGFP como primera aproximación del sistema de vectores.

3.- El promotor mínimo que se construya será funcional.

## **6. OBJETIVOS**

6.1 Completar la evaluación del efecto del antibiótico regulador Novobiocina en la actividad neuronal de rebanadas de cerebro de ratón:

Se realizarán registros electrofisiológicos de campo en rebanadas de cerebro de ratón tratadas con tres concentraciones de Novobiocina alrededor de la concentración recomendada para frenar la transcripción *in vitro* del sistema. Esta estrategia permitirá aproximar la viabilidad de utilizar este sistema de inducción en ratones transgénicos.

6.2 Iniciar la construcción de los plásmidos correspondientes:

Para efectos de la presente tesis se pretende comenzar la construcción del sistema en una configuración bastante más simplificada (ver figura 15). El primer paso para la construcción del sistema propuesto (ver figura 8) será añadir la secuencia codificante para la proteína verde fluorescente (EGFP) al vector pF12A RM Flexi del sistema base de inducción génica. Posteriormente, se construirá el promotor mínimo del gen *Arc/Arg3.1* basándose en lo reportado por el grupo del Dr. H. Bito (Kawashima et al., 2009), y éste promotor mínimo reemplazará al promotor original del pF12A RM Flexi para regular la transcripción de la EGFP.

6.3 Probar la construcción en una línea neuronal:

Se optimizarán los parámetros de transfección en una línea neuronal seleccionada. Acto seguido se probará la efectividad del promotor mediante la inducción de la expresión de *Arc/Arg3.1* y por lo tanto del reportero transfectado en la línea neuronal.

## **7. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **7.1 Evaluación del efecto de la Novobiocina**

Se emplearon 6 ratones de la cepa C57BL/6J de entre 3 y 8 meses de edad. Los ratones fueron anestesiados con pentobarbital 50mg/kg administrado intraperitonealmente, y perfundidos transcardialmente con una solución sacarosa (Sacarosa 238 mM, Glucosa 30 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, KCL 3 mM, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM) ó bien de glicerol (Glicerol 250 mM, KCl 2.5 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.2 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.4 mM, NaHCO<sub>3</sub> 26 mM y Glucosa 11 mM) oxigenada previamente (95%O<sub>2</sub> y 5%CO<sub>2</sub>) por más de 30 min a 4°C. Posteriormente, se les decapitó para remover el cerebro, el cual se sumergió en solución de sacarosa oxigenada continuamente, se hemisectó por la línea sagital medial y se removió el cerebelo. El hemiserebro se fijó con pegamento en un bloque de agar con inclinación de 30° y fue asegurado a un vibratomo (Leica VT 1000S). Se prepararon rebanadas horizontales de 400  $\mu$ m de grosor y se incubaron al menos 50 min en aCSF (118 mM NaCl, KCl 3 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM, D-glucosa 30 mM, pH 7.4) para su recuperación oxigenando continuamente.

Mientras tanto, se preparó la cámara de registro electrofisiológico lavándola con 30 ml de cloro, 60 ml de alcohol 90% y 300 ml de agua desionizada hirviendo (solución de lavado). Posteriormente se hicieron circular 30 ml de aCSF a 32°C en constante oxigenación, y la rebanada se transfirió a la cámara de registro donde se dejó reposando durante al menos 20 min. Los registros de campo fueron efectuados utilizando un electrodo de succión conteniendo aCSF, localizado en la superficie de la capa piramidal de CA1 en la rebanada. La señal fue amplificada y filtrada (highpass 10 Hz, lowpass 3 KHz) con un amplificador de banda ancha (Grass Instruments, Quincy, MA, U.S.A.). Una vez estabilizado el trazo, se registró durante 20 minutos la actividad espontánea basal a manera de control.

Se procedió a agregar el antibiótico Novobiocina diluido en DMSO (dimetil sulfóxido, Sigma CAT: 472301) de modo que no superase 0.01% de DMSO en el aCSF circulante, alcanzando la concentración deseada de Novobiocina (1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) y registrando durante 45 min con cada concentración. Después se agregó Lidocaína 1 mM para bloquear la actividad neuronal y se registró durante 10 min como control de la viabilidad del registro.

Finalmente se aplicaron 10 pulsos de 5  $\mu\text{V}$  para calibrar el trazo. Todos los registros se digitalizaron a una frecuencia de entre 3 y 9 KHz y se guardaron en una computadora personal con un sistema de adquisición de National Instruments (Austin, Tx, U.S.A.). Al finalizar, la cámara de registro se lavó con la solución de lavado.

Para el análisis de los registros se empleó el programa Clampfit del software pCLAMP9.0 (Axon Instruments Inc. 2003) para realizar un análisis del espectro de potencia. Se seleccionaron tres intervalos de 5 seg representativos de la actividad comprendidos dentro de los 5 min finales de cada tiempo/condición, de manera que se muestrearon 15 seg del trazo por cada condición. Se separó el espectro de potencia de dichos experimentos en 5 bandas de frecuencia y se les aplicó la transformada rápida de Fourier con una ventana de Hamming con resolución aproximada de 0.5 Hz/bin. Se integró la potencia y se generó una tabla en formato atf (axon text file) conteniendo la potencia en cada punto de frecuencia muestreado. Posteriormente se convirtió cada archivo al formato txt para analizar los datos con el software R versión 2.15.1 (Copyright 2012, The R Foundation for Statistical Computing), utilizando el código contenido en la sección de Anexos del presente trabajo.

El programa extrajo los datos biológicamente relevantes (de 1 a 60 Hz) del espectro de potencia, validó cada archivo comprobando que la suma de la potencia registrada después de la administración de Lidocaína fuese menor a la mitad de la registrada como actividad basal, y posteriormente eliminó de todos los archivos las frecuencias en donde la diferencia entre la actividad basal y la actividad con lidocaína no fuese menor a  $1\text{e-}17 \text{ V}^2/\text{Hz}$ , que corresponde al umbral establecido como ruido. Así mismo, agrupó los puntos de frecuencias en rangos correspondiendo a las bandas de frecuencia considerando la clasificación de Cotic y colaboradores (2011):

- a. Delta: 1 a 4 Hz.
- b. Theta: 4 a 8 Hz.
- c. Alpha: 8 a 15 Hz.
- d. Beta: 15 a 40 Hz.
- e. Gamma: 40 a 100 Hz.

Las potencias comprendidas en cada rango de frecuencia determinado se sumaron en

cada experimento para obtener un dato de cada condición en cada uno de los 6 experimentos validados, obteniendo una N=6 observaciones por rango de frecuencia y condición (Basal, T1, T2, T3 y Lidocaína).

Así mismo, el código automatizó la evaluación de la normalidad en dichos datos al graficar (con los denominados 'Q-Q plots') los cuartiles de una distribución Gaussiana contra los cuartiles de los datos muestrales. Debido a la evidente ausencia de normalidad, se utilizó la prueba Wilcoxon-Mann-Whitney (que utiliza un estimador para la mediana de las diferencias entre las dos muestras) para evaluar si existen diferencias significativas entre las muestras de datos de cada condición con respecto a la condición basal. Considerando que cada dato de la condición basal se obtuvo de la misma rebanada que el dato correspondiente del resto de las condiciones, la prueba se efectuó de manera pareada. El valor alpha utilizado como umbral de significancia estadística fue del 5%. Además, para cada criterio de rango de frecuencia, se graficó por una parte la media de la potencia en cada condición y su desviación estándar, y por otra la mediana de cada rango y la desviación absoluta de la mediana con el fin de ilustrar la variabilidad de los datos.

Se registraron 6 rebanadas cuyo trazo fue validado como actividad biológica si al ante la presencia de Lidocaína 1mM la actividad de campo disminuía al menos a la mitad de la actividad basal. Las 5 condiciones experimentales se describen a continuación: A manera de control se registró cada rebanada durante 20 min (condición 'Basal') antes de añadir Novobiocina 1  $\mu$ M y registrar durante 45 min (condición 'T1'), procediendo a añadir Novobiocina para alcanzar una concentración final de 3  $\mu$ M en el aCSF circulante registrando igualmente durante otros 45 min (condición 'T2'), y posteriormente se registró durante 45 min en presencia de Novobiocina 10  $\mu$ M (condición 'T3'), para finalmente añadir Lidocaína 1mM para suprimir la actividad neuronal.

## 7.2 Construcción del sistema de vectores

### 7.2.1 Características principales de los plásmidos utilizados

- pEGFP-N1: Número de acceso a GenBank (GBA#) U5576, con un tamaño de 4.7 kb, confiere resistencia a Kanamicina y Neomicina, comercializado por Clontech (Cat: 6085-1).
- pJet1.2: GBA# EF694056, con un tamaño de 2.97 kb, confiere resistencia a Ampicilina, comercializado por Fermentas (Cat: K1231).
- pF12A RM Flexi Vector: GBA# EF030520, con un tamaño de 3.47 kb, confiere resistencia a Ampicilina, comercializado por Promega (Cat: C9470).
- pReg-Neo Vector: GBA# EF030522, con un tamaño de 6.8, confiere resistencia a Ampicilina y Neomicina, comercializado por Promega (Cat: C9470).
- pGL4.11-Arc7000-Venus-pest: Codifica la proteína amarilla fluorescente (YFP) bajo las 7000 bases del promotor y potenciador del gen *Arc/Arg3.1*. Proporcionado amablemente por el Dr. H. Okuno (Universidad de Tokyo). Confiere resistencia a Ampicilina, y tiene un tamaño de 10.71 kb.

### 7.2.2 Diseño de los oligonucleótidos

#### I. Para amplificar SARE:

Se diseñó un par de oligonucleótidos para amplificar la secuencia de 100pb correspondiente al potenciador principal de Arc (SARE), reportado en el genoma de ratón aproximadamente 7kb río arriba del inicio de transcripción (Kawashimae et al., 2009). Las secuencias se muestran en la Tabla 1, junto con sus características principales. Estos oligos se diseñaron seleccionando las secuencias flanqueando los nucleótidos 313-421 del plásmido pGL4.11-Arc7000-Venus-pest, y añadiendo el sitio de restricción para NdeI. El tamaño esperado del producto amplificado es de 108 pb.

#### II. Para amplificar ArcMin:

Se diseñó un par de oligonucleótidos para amplificar la secuencia del promotor proximal ArcMin basándose en el reporte de Kawashima y colaboradores (2009). El oligonucleótido ArcProx\_FW se diseñó con 10 pb complementarias al oligonucleótido SARE\_RV (subrayadas en Tabla 1), para permitir la unión de ambas secuencias mediante

PCR y armar así el promotor mínimo de Arc. Las secuencias flanquean los nucleótidos 7275-6873 del plásmido pGL4.11-Arc7000-Venus-pest y le añaden el sitio de restricción para SacI. El tamaño esperado del producto de amplificación es de 402 pb.

### III. Para amplificar EGFP:

Se utilizó la herramienta recomendada por Promega (Flexi® Vector Primer Design Tool) para diseñar oligonucleótidos que añadan los sitios de restricción para las enzimas SgfI y PmeI en los extremos de la secuencia amplificada, y permitir así su inserción al vector pF12A RM Flexi. Las secuencias se muestran en la Tabla 1. El tamaño esperado del producto de la amplificación es de 745 pb.

**Tabla 1.-** Secuencias y características de los oligonucleótidos diseñados.

Nombre	Secuencia (5' – 3'). Sitios de restricción resaltados. Secuencias complementarias subrayadas.	T <sup>m</sup>	Tamaño	Sitio de restricción
SARE_FW	TATTACTCATATGCAGCGCACAGACCTTCCTGC	78.3°C	34 pb	NdeI
SARE_RV	CCTCCCAGAGCCAGCCCAGCAGCAGCCTGCCTGCTTC	90.7°C	37 pb	---
ArcProx_FW	CTCTGGGAGGGCGCAGCAGAGCACATTAGTC	81.0°C	31 pb	---
ArcProx_RV	TAATATCTCGAGCTCTGGTCGTCGGTGTGCG	79.1°C	32 pb	SacI
GFP_FW	ATATGCGATCGCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTC	72.0°C	40 pb	SgfI
GFP_RV	ACGCGTTTAAACTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAGTGATCC	72.0°C	47 pb	PmeI

#### 7.2.3 Transformaciones

Tubos de 1.5 ml se enfriaron en hielo durante 5 min y luego se adicionaron de 50-100 µl de células competentes XL1-Blue recién descongeladas obtenidas de la Unidad de Proteogenómica. Posteriormente se agregaron los volúmenes de los plásmidos a transformar (<10% del volumen de competentes) y la mezcla se dejó reposar en hielo de 20-30 min. Se les dio un choque térmico de 3 min a 42°C y se devolvieron al hielo 2 min para su recuperación. Se agregaron 500ul de medio LB (por sus siglas en inglés: ‘Lysogeny Broth’) sin antibiótico y se les incubó durante 1hr a 37°C en agitación. Posteriormente sembraron 400 µl de dilución 1:100 en cajas de cultivo conteniendo medio LB con Ampicilina (80µg/ml) ó Kanamicina (30µg/ml). Las cajas se incubaron a 37°C (a excepción de las transformantes con el vector pGL4.11-Arc7000-Venus-pest, que crecen a baja temperatura, entre 30 y 33°C) por 12-48 horas.

#### 7.2.4 Reacciones en cadena de la polimerasa (PCRs)

IV. En el caso de la amplificación de la secuencia del promotor proximal de Arc (ArcProx) y de la secuencia correspondiente a la región SARE:

Sobre hielo, se realizó la mezcla total para todas las reacciones de los siguientes reactivos: Buffer para PCR (Sigma) 1x, MgCl<sub>2</sub> [1.5 mM], dNTPs [0.2 mM], oligonucleótido SARE\_FW [0.5 μM], oligonucleótido SARE\_RV [0.5 μM], oligonucleótido ArcProx\_FW [0.5 μM], oligonucleótido ArcProx\_RV [0.5 μM], 150 ng del vector pGL4.11-Arc7000-Venus-pest, 5U de Taq\_Polimerasa (Sigma) y se aforó con H<sub>2</sub>O libre de nucleasas al volumen correspondiente a 3 reacciones de 20 μl. En el termociclador se utilizó el programa: 2 min 95°C, [40 seg 95°C , 40 seg 56°C, 40 seg 72°C] x 22 ciclos, 5 min 72°C y finalmente se mantuvo a <12°C hasta verificar los productos en un gel de agarosa (fragmentos de 108 y 402 pb).

V. En el caso de la amplificación de la secuencia codificante para EGFP:

Sobre hielo, se realizó la mezcla total para todas las reacciones de los siguientes reactivos: Buffer para PCR (Sigma) 1x, MgCl<sub>2</sub> [1.5 mM], dNTPs [0.2 mM], oligonucleótido GFP\_FW [0.5 μM], oligonucleótido GFP\_RV [0.5 μM], 320 ng del vector pEGFP-N1, 5U de Taq\_Polimerasa (Sigma) y se aforó con H<sub>2</sub>O libre de nucleasas al volumen correspondiente a 3 reacciones de 20 μl. En el termociclador se utilizó el programa: 5 min 94°C, [30 seg 95°C , 30 seg 57.1°C, 1 min 72°C] x 25 ciclos, 10 min 72°C y finalmente se mantuvo a 4°C hasta verificar en un gel de agarosa el fragmento de 745pb.

VI. Para armar el promotor mínimo de Arc (SARE-ArcMin):

Sobre hielo, se realizó la mezcla total de los siguientes reactivos: Buffer para PCR (Sigma) 1x, MgCl<sub>2</sub> [1.5 mM], dNTPs [0.2 mM], 30 ng de fragmento SARE purificado, 30 ng de fragmento ArcMin purificado, 5U de Taq\_Polimerasa (Sigma) y se aforo con H<sub>2</sub>O a 60 μl. Se distribuyeron 20 μl de la mezcla realizada en tubos para PCR, y se corrió el programa: 2 min 95°C, [30 seg 95°C , 30 seg 57°C, 40 seg 72°C] x 4 ciclos. Posteriormente, se añadieron los oligonucleótidos SARE\_FW [0.5μM] y ArcProx [0.5μM] a cada reacción y se realizó una curva de temperaturas con el siguiente programa en el termociclador: 30 seg a 95°C, [30 seg a

95°C, 30 seg a 55/57.6/63 °C, 45 seg a 72°C] x 22 ciclos, 5 min 72°C, y finalmente a <12°C hasta verificar el producto en un gel de agarosa, con la presencia del fragmento esperado de 550pb.

#### 7.2.5 *Para verificar insertos en colonias de bacterias*

Sobre hielo, se realizó la mezcla total para todas las reacciones de los siguientes reactivos: Buffer para PCR (Sigma) 1x, MgCl<sub>2</sub> [1.5 mM], dNTPs [0.2 mM], oligonucleótido\_FW [0.5 μM], oligonucleótido\_RV [0.5 μM], 5U de Taq\_Polimerasa (Sigma) y se aforó con H<sub>2</sub>O al volumen correspondiente a las reacciones/colonias que se deseen realizar. Se distribuyeron 20 μl de la mezcla realizada en tubos para PCR, y se les introdujo un palillo estéril con muestra de las colonias a verificar. En el termociclador se corrió el programa: 3 min 95°C, [30 seg 94°C, 40 seg 55°C, (1min/kb) 72°C] x 25 ciclos, 5 min 72°C y finalmente se mantiene a <12°C hasta corroborar el producto en un gel de agarosa.

#### 7.2.6 *Digestiones*

Para la digestión de los plásmidos de interés se emplearon las enzimas de restricción a una concentración de 2 Unidades (U) por μg de DNA y el buffer sugerido por el proveedor. Después del periodo destinado a la restricción, las enzimas se inactivaron incubando a 65°C durante 15 min. En caso de dobles restricciones se identificó el buffer que permitiera la digestión óptima según las indicaciones del proveedor, ó bien se enriqueció para mejorar la actividad de la segunda enzima.

En el caso de la digestión con las enzimas XhoI (Fermentas, Cat: ER0691) y HindIII (Sigma, MDL: MFCD00166570) se digirieron 950 ng del plásmido FAGFP con 15U de HindIII y Buffer-SB diluido 1X en H<sub>2</sub>O libre de endonucleasas para tener 30 μl de volumen total, incubando a 37°C durante 1.5 hrs; después se retiraron 2 μl y al resto se añadieron 15U de XhoI y 3 μl de MgCl<sub>2</sub>[1M], se incubó a 37°C durante 1.5 hrs.

Al mismo tiempo, 1.67 μg del plásmido Pmin-pJet fueron digeridos con 15U de HindIII y Buffer-SB (Sigma) diluido 1X en H<sub>2</sub>O libre de endonucleasas para tener 30 μl de volumen total, incubando a 37°C durante 1.5 hrs, y a 65°C durante 15 min; después se apartaron 2 μl y al resto se agregaron 10U de XhoI y 3 μl de MgCl<sub>2</sub>[1M], incubando a 37°C durante solo 30 min para tener digestión parcial, y a 65°C durante 20 min para inactivar la enzima.

Para corroborar la identidad del plásmido FAGFP-Pmin se usaron enzimas de restricción que liberasen al fragmento Pmin y al fragmento codificante para EGFP. Para liberar el fragmento de Pmin se utilizó el Buffer para NdeI (Fermentas) diluido 1X en los 20 µl de volumen de reacción con 1µl de enzima NdeI-FastDigest (Fermentas Cat: FD0583), 500 ng de plásmido y el resto de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas, se incubó la mezcla a 37°C durante 10 minutos, y a 65°C durante 15 minutos para inactivar la enzima. A 10 µl de la primera digestión, se añadieron 20U de la enzima SacI (Fermentas Cat: ER1131) y Buffer-Tango diluido 1X en 20µl de reacción total aforada con H<sub>2</sub>O libre de endonucleasas, se incubó la mezcla 1.5 hrs a 37°C. Por otro lado, para comprobar la presencia de EGFP se utilizó el producto “10X Flexi Enzyme Blend” de Promega (Cat: R1851), procediendo conforme a la hoja técnica.

#### 7.2.7 *Extracción de ADN plasmídico (MidiPrep)*

Se sembraron colonias de bacterias en 25-50 ml de medio LB con antibiótico (80µg/ml en el caso de Ampicilina y 30µg/ml en el caso de Kanamicina) y se incubaron en agitación por al menos 12 horas a 37°C. Después, las células se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 min, y la pastilla se resuspendió en 2ml solución I (TRIS (25mM) –Glucosa (50mM) – EDTA(10mM)). Luego, se agregaron 4ml de solución II (SDS 1% y NaOH 0.2N preparada en el momento), y se mezcló suavemente. El lisado celular se mezcló vigorosamente con 3 ml de solución III (acetato de potasio [5M] 60% y ácido acético 11.5%) y se dejó reposar 5min en hielo.

Posteriormente la mezcla se centrifugó a 4°C y 9000 rpm durante 15min. El sobrenadante se filtró con una gasa, se precipitó con isopropanol (0.6 vol) mezclando y dejando reposar 10min. Nuevamente se centrifugó y la pastilla se lavó con 5ml de etanol 75% y se resuspendió en una solución de TRIS-EDTA (Tris 10mM pH 7.6 , EDTA 1mM, pH 8). Se incubó con 10 µl de RNAasa [10 µg/ml] durante 30 min a 37°C. El ADN se precipitó con una solución de polietilenglicol-NaCl (13% Polietilenglicol, 6M NaCl) dejando reposar 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó 10min a 13000 rpm. Finalmente se lavó con etanol al 80%, se dejó secar, y el ADN se resuspendió en agua libre de nucleasas.

#### 7.2.8 *Purificación de fragmentos en gel*

Se utilizó el kit “Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega Cat: A9281),

siguiendo el protocolo indicado en la hoja técnica. Se implementó también el “Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit” (Cat: D4036) siguiendo el protocolo indicado en la hoja técnica.

#### 7.2.9 *Defosforilaciones*

Para defosforilar los plásmidos y evitar auto-ligaciones que disminuirían la eficiencia de transformantes con el inserto deseado, se utilizó la Rapid Alkaline Phosphatase de Roche (Cat: 04 898 133 001) conforme al procedimiento indicado en la hoja técnica, pero adaptando a los volúmenes obtenidos de la purificación de plásmido.

#### 7.2.10 *Ligaciones:*

Se utilizó la ligasa T4 de Fermentas (Cat: EL0011) siguiendo las recomendaciones del proveedor. Se dejó incubando a temperatura ambiente siempre por más de 4 hrs.

### **7.3 Evaluación del sistema en cultivos neuronales**

#### *7.3.1 Descongelación de células*

Se colocaron 5 ml de medio DMEM (por sus siglas en inglés: ‘Dulbecco's Modified Eagle's Medium’) de Gibco (Cat: 11995-123) con 10% de suero bobino fetal (SBF) de Gibco (Cat: 261400), en una botella de cultivo T-25 y se incubó durante 20min a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> para permitir que se estabilizaran el pH y la temperatura. Las células se descongelaron en baño a 37°C, y rápidamente se colocaron en la botella anotando el número de pase. Se dejaron incubando a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y al siguiente día se cambió el medio para retirar el DMSO que había quedado del medio de congelación y se agregó Penicilina-Estreptomicina (100 µg / ml) de Invitrogen (Cat: 15140122) al medio.

#### *7.3.2 Purificación de plásmidos a transfectar*

Se crecieron 50 ml de LB con antibiótico bacterias transformadas con los plásmidos destinados a transfectar la línea neuronal. Se incubaron a 37°C (ó 33°C en el caso del vector pGL4.11-Arc7000-Venus-pest) en agitación por más de 12 hrs. Se purificaron con el “Plasmid *Plus* Midi Kit” de Quiagen (Cat: 12943), siguiendo las instrucciones de la hoja técnica.

#### *7.3.3 Pases (tripsinizar)*

Se temperizaron las soluciones a 37°C. El cultivo de células estaba al 90% de confluencia. En campana, se extrajo el suero con pipeta y se lavó con 3 ml de amortiguador de fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés: ‘Phosphate-Buffered Saline’ compuesto de 1.37M NaCl, 27mM KCl, 100mM Na<sub>2</sub>HCO<sub>4</sub> y 10mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en H<sub>2</sub>O) a pH 8 estéril, asegurándose de retirar todo. Se agregaron 2.5 ml de Tripsina (Gibco, Cat: 15050) y se incubó durante 7 min a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

En caso de que aún no se despegasen todas las células, se dieron ligeros golpes a la botella para promover la disgregación. Se agregaron 2.5 ml de medio D-MEM+SBF10% y se mezcló con pipeta. Se dejaron decantar las células unos minutos para no llevar aglomerados antes de sembrarlas. Se preparó una botella T-25 con 4.5 ml de SBF (Suero Bovino Fetal) y 500 µl de células tripsinizadas para hacer el pase. Se incubó a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>.

#### 7.3.4 Siembra de placas

La siembra de células en placas de cultivo con fondo adherente se realizó según las indicaciones de la Lipofectamina LTX de Invitrogen, que era la recomendada para transfectar las células de la línea N2A (ver Tabla 2).

**Tabla 2.** Protocolo para siembra y transfección de células basado en las instrucciones de uso del producto Lipofectamina LTX de Invitrogen.

Células	Placa de cultivo	Área por pozo	Volúmen a sembrar	Células por pozo	Volúmen de medio de dilución	Cantidad de DNA a transfectar	Cantidad de Lipofectamina
N2A	96 pozos	0.3 cm <sup>2</sup>	100 µl	1.0 x 10 <sup>4</sup>	20 µl	50 ng	0.5 µl
N2A	24 pozos	2 cm <sup>2</sup>	500 µl	5.0 x 10 <sup>4</sup>	100 µl	250 ng	2.5 µl

#### 7.3.5 Transfecciones

Un día previo a la transfección, las células al 90% de confluencia se disgregaron con tripsina y se contaron. Se multiplicó el promedio del conteo celular por el factor de la cámara (10,000) y el por factor de dilución (4) para obtener la concentración de células/ml. Se hicieron los cálculos correspondientes para tener en promedio cierto número de células por pozo (ver Tabla 2), y finalmente se sembró la cantidad correspondiente en cada pozo y se incubó la placa a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>.

El día de la transfección, se utilizó la Lipofectamina-LTX (Invitrogen, Cat: 15338030) con las cantidades indicadas en el manual de Invitrogen para las líneas celulares (ver Tabla 2). Se preparó la mezcla de transfección mezclando el Opti-Mem (Invitrogen, Cat: 31985-062) con el plásmido determinado en un tubo de 1.5 ml, y se dejó reposar 10 min. En otro tubo se agregaron la Lipofectamina-LTX y el Opti-MEM, manteniendo una proporción de Lipofectamina: plásmido de 2.5:1. La mezcla se dejó reposar de 5 a 10 min y después se mezcló con la mezcla del ADN. Se incubó la mezcla al menos 25 min, se añadió a cada pozo de la placa y se incubó a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>.

#### 7.3.6 Diferenciación de células

Se cambió el medio a las células por el medio de diferenciación. El medio de diferenciación se compone de: medio Neurobasal con [1mM] db-AMPC (Dibutiril Adenosín Monofosfato-3',5' cíclico, Sigma, Cat: 16980-89-5), SBF (Gibco, Cat: 26140079) al 0.25% y suplemento N2 (Gibco, Cat: 17502-048) al 1%, el cual consiste en 5 µg/ml de insulina, 100

$\mu\text{g/ml}$  de transferrina, progesterona 20 nM, putrescina 100  $\mu\text{M}$  y selenio 30 nM (Bottenstein y Sato, 1979). Se incubaron a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>, manteniendo en observación hasta pasadas 12-72 hrs.

#### 7.3.7 *Para inducir y evaluar la expresión de Arc/Arg3.1*

. La inducción de la expresión de Arc/Arg3.1 se realizó administrando 100ng/ml de NGF-7S (Factor de Crecimiento Neural 7S, Alomone Labs, Cat: N-130) a las células, con base en el reporte de Dickey y colaboradores (2004). La expresión se evaluó cuantificando el número de células fluorescentes.

#### 7.3.8 *Para la tinción y fijación de células*

En la mayoría de los experimentos, se procedió a teñir los núcleos celulares con DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol) 1:700 diluido en PBS incubando durante 45 min las placas fijadas previamente con PFA (Paraformaldehído) 4% y lavando con TBS 1%.

#### 7.3.9 *Conteo de células fluorescentes*

Para la detección de las células EGFP-positivas se utilizó el programa ImageJ: se estableció un umbral de la intensidad de fluorescencia utilizando el método “Default” de ImageJ, el cual determinaría visualmente la intensidad a partir de la cual se consideraría EGFP-positiva a cada célula o no. El valor del umbral se estableció de manera que se obtuviese la mayor cantidad de células con fluorescencia dentro de los cuerpos celulares, resultando en una disminución del ruido y una maximización de la cantidad de células con marca fluorescente de EGFP. Se contaron como fluorescentes únicamente las células cuyo núcleo estuviese rodeado de señal fluorescente, no se consideraron en el conteo a las células que colindaban con el margen de la fotografía y se mantuvo el mismo umbral de fluorescencia por grupo de imágenes (cada conjunto de fotos pertenecientes a un experimento fue constituido por dos grupos: el control positivo transfectado con pEGFP-N1, y las células transfectadas con el plásmido FAGFPpMin).

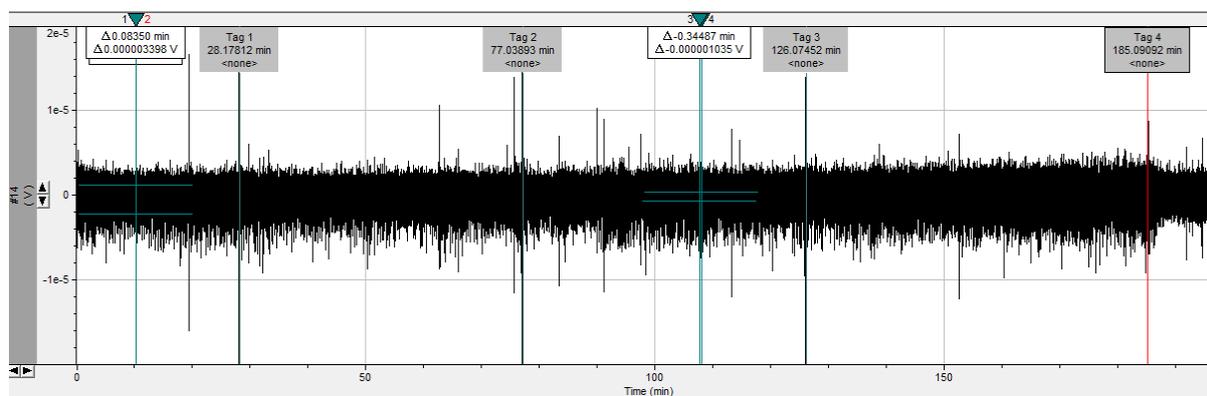
Para evaluar la eficiencia de transfección se evaluó como control positivo el vector EGFP-N1, y se calculó el porcentaje de células EGFP-positivas con base en el total de células contabilizadas ya sea mediante la detección de núcleos teñidos con DAPI ó de las células totales vistas con luz transmitida. Mientras que para evaluar la eficiencia de inducción del

pMin, se buscó detectar la mayor cantidad de células EGFP-positivas en las muestras transfectadas con el plásmido FAGFPpMin inducidas con NGF, y con el mismo umbral se cuantificaron las células EGFP-positivas en las muestras transfectadas con el plásmido FAGFPpMin pero no inducidas, para finalmente calcular el porcentaje con base en el total de células en la foto.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 El efecto de Novobiocina en la actividad neuronal

La Novobiocina es el fármaco que se contempla utilizar para delimitar la ventana de la inducción del transgen regulado en el sistema de regulación propuesto. Por ello era importante evaluar si el antibiótico no afectaba la actividad espontánea de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo. Las concentraciones de Novobiocina evaluadas fueron de 1, 3 y 10  $\mu\text{M}$  (ver figuras 11 y 12).

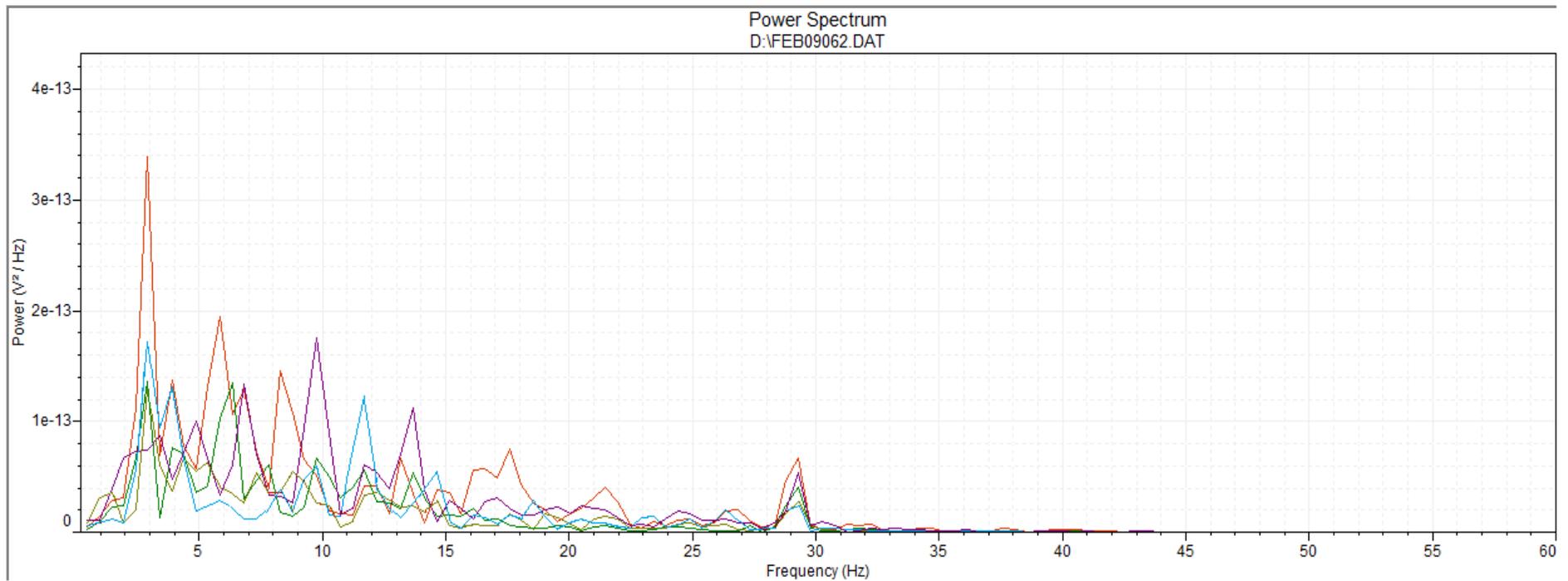


**Figura 11.-** Trazo representativo de los registros de la actividad espontánea en la región CA1 de rebanadas horizontales de cerebro de ratón durante 200 min. En el eje de las ordenadas se indica el voltaje (V). En el eje de las abscisas se observa el tiempo (min) de registro, donde los primeros minutos corresponden a la actividad basal, la leyenda “Tag1” indica la adición de Novobiocina 1  $\mu\text{M}$ , la leyenda “Tag2” indica la adición de Novobiocina 3  $\mu\text{M}$ , la leyenda “Tag3” indica la adición de Novobiocina 10  $\mu\text{M}$  y la leyenda “Tag4” sobre la línea roja indica la adición de Lidocaína 1 mM.

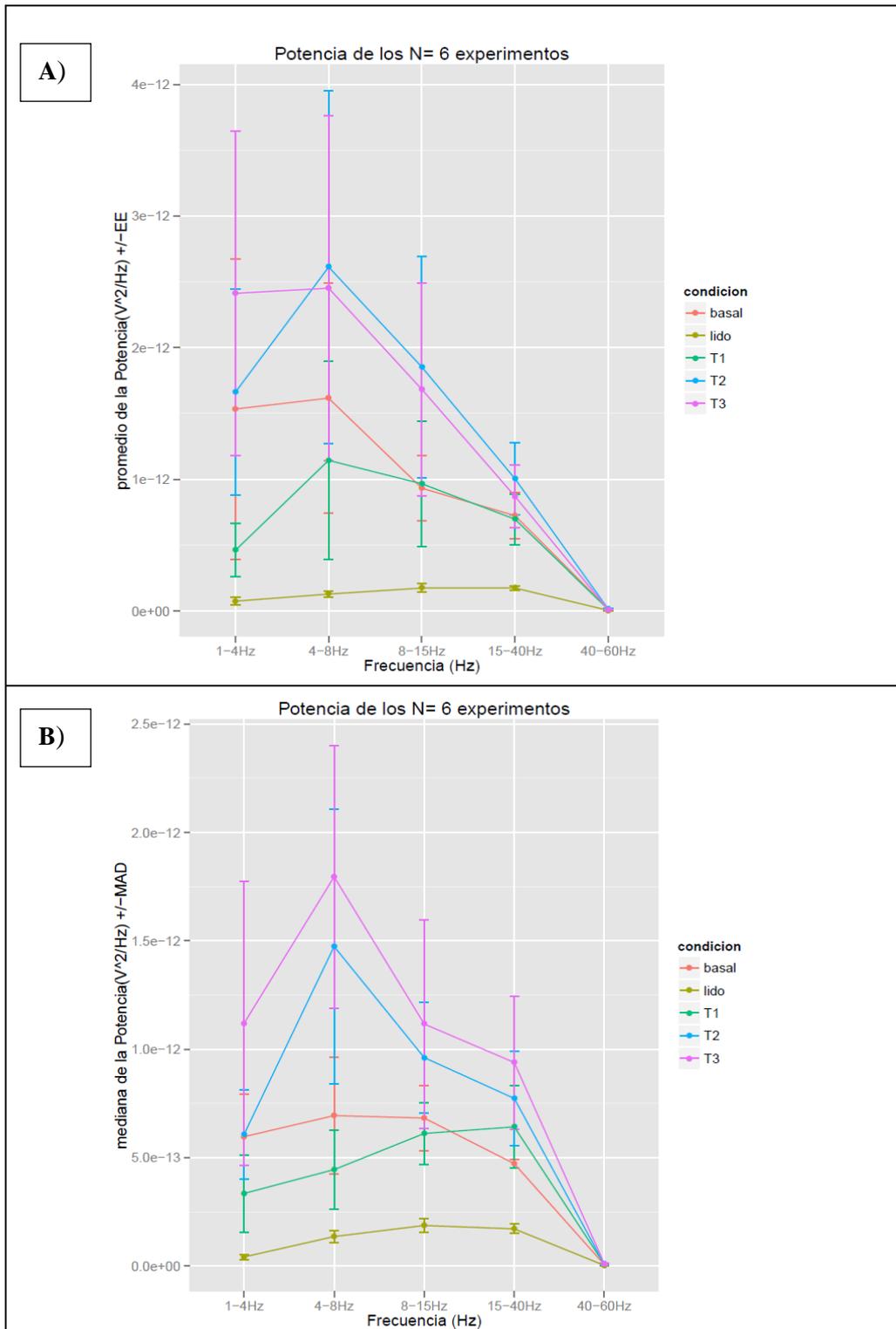
Se comparó la actividad registrada en cada condición (T1, T2, T3 y Lidocaína) con respecto a la condición basal efectuando la prueba no paramétrica Mann-Whitney-Wilcoxon para evaluar si las poblaciones subyacentes a los datos muestreados siguen la misma distribución. El análisis de las 6 rebanadas experimentales reveló que, dado un valor alfa de 0.05, no existen diferencias significativas en la actividad muestreada ante la administración de las tres concentraciones de Novobiocina con respecto a la actividad basal en ningún rango de frecuencia.

En las gráficas se aprecia que la variación es relativamente alta en todas las condiciones, lo que contrasta con la baja variabilidad en los datos de la condición con Lidocaína (ver Figura 13), por lo que sería conveniente aumentar la N para intentar disminuir

la variabilidad y así corroborar dichos resultados. Sin embargo, el análisis de los datos muestra que el antibiótico Novobiocina administrado en el rango de concentración de  $1\mu\text{M}$  a  $10\mu\text{M}$  no afecta la actividad poblacional espontánea de las células piramidales de la región CA1 hipocampal en rebanadas de cerebro de ratón y por lo tanto este antibiótico podría ser utilizado para inducir el sistema de expresión aquí desarrollado.



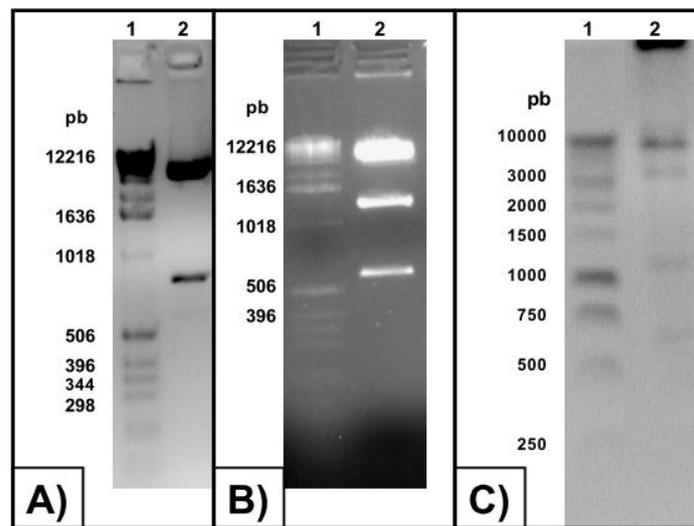
**Figura 12.-** Espectro de Potencia (Densidad espectral) de la actividad muestreada a partir de un trazo representativo de los registros de la actividad espontánea en la región CA1 de rebanadas de cerebro de ratón durante 200 min. En el eje de las abscisas se indica la Frecuencia (Hz), y el eje de las ordenadas muestra la Potencia de la densidad espectral ( $V^2/Hz$ ) correspondiente. Las líneas de colores representan la actividad correspondiente a cada condición: roja a Basal, verde seco a Lidocaína 1 mM, turquesa a T1 (Novobiocina 1  $\mu M$ ), azul a T2 (Novobiocina 3  $\mu M$ ), y fuchsia a T3 (Novobiocina 10  $\mu M$ ).



**Figura 13.- A)** Promedio y error estándar (EE) de la potencia registrada en 6 rebanadas en 5 rangos de frecuencia ante distintas condiciones: los 20 min iniciales (basal), Novobiocina 1 $\mu$ M (T1), Novobiocina 3 $\mu$ M (T2), Novobiocina 10 $\mu$ M (T3), y Lidocaína 1mM (lido). **B)** Mediana y desviación absoluta de la mediana (MAD) de la potencia registrada en 6 rebanadas en 5 rangos de frecuencia ante distintas condiciones: los 20 min iniciales (basal), Novobiocina 1 $\mu$ M (T1), Novobiocina 3 $\mu$ M (T2), Novobiocina 10 $\mu$ M (T3), y Lidocaína 1mM (lido).

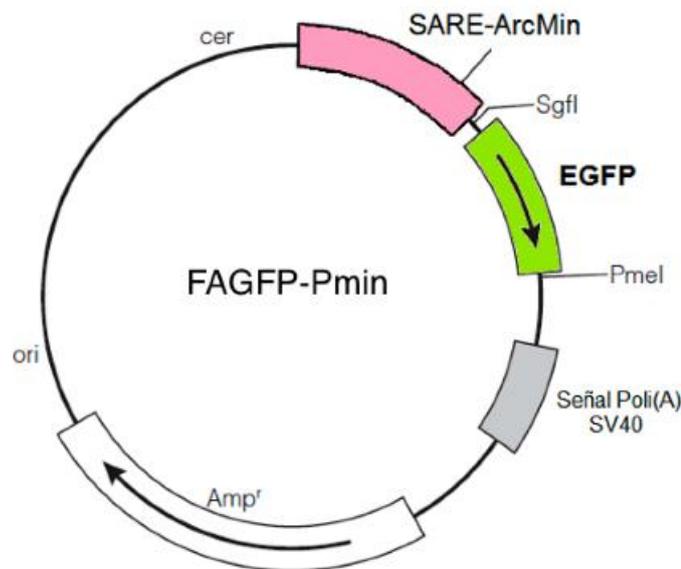
## 8.2 De la construcción del sistema de regulación propuesto

Se amplificaron los plásmidos que serían empleados en este trabajo: bacterias competentes (XL1-Blue) se transformaron con los vectores pReg-Neo, el pEGFP-N1, y el pGL4.11-Arc7000-Venus-pest para amplificar las secuencias. Los plásmidos se purificaron como se describe en ‘Material y Métodos’ y posteriormente se digirieron con diferentes enzimas de restricción y cada uno de los plásmidos generó el patrón de bandas esperado (ver figura 14).



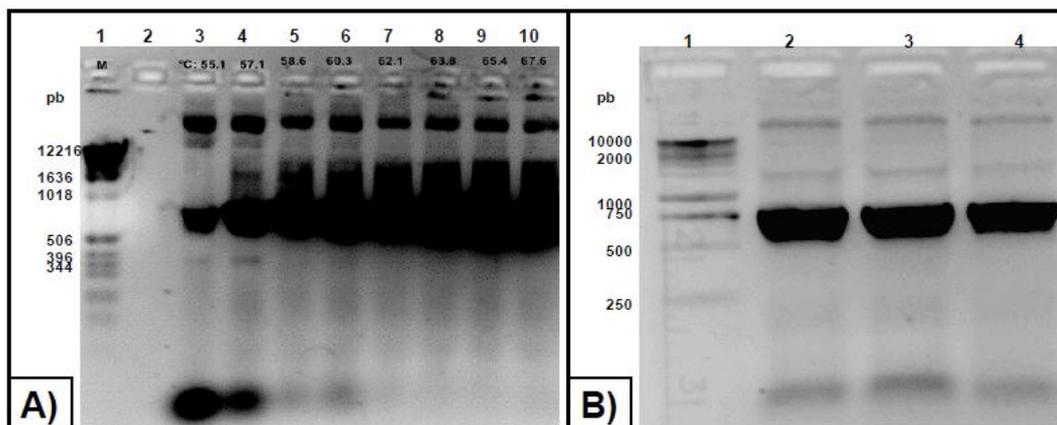
**Figura 14.-** Patrón de restricción para verificar la identidad de los plásmidos. **A)** Digestión del vector pEGFP-N1 con las enzimas EcoRI y NotI, se observan los fragmentos esperados de 4558 y 772 pb. **B)** Vector pGL4.11-Arc7000-Venus-pest digerido con la enzima BglI, se observan los fragmentos esperados de 615, 1090, 2562, 3032 y 4319 pb. **C)** Vector pReg-Neo digerido con las enzimas EcoRI y Sall, se observan los fragmentos esperados de 583, 1279 y 4940 pb.

Una vez corroborada la identidad de los plásmidos, se comenzó con la construcción del plásmido descrito en el segundo objetivo de este trabajo. Para ello se pretendía en primer instancia añadir la secuencia codificante para la EGFP al vector pF12A RM Flexi del sistema base de inducción génica. Posteriormente se pretendía construir el promotor mínimo del gen *Arc/Arg3.1* denominado SARE-ArcMin y descrito por Kawashima y colaboradores 2009. Con el promotor mínimo se reemplazaría al promotor original del pF12A RM Flexi y de esta forma se regularía la transcripción de la EGFP de manera dependiente de la actividad neuronal que sería reportada por la expresión del *Arc/Arg3.1* endógeno (ver figura 15).



**Figura 15.-** Diagrama del sistema propuesto acotado a los objetivos de este trabajo. Se propuso modificar el plásmido ‘pF12A RM Flexi’ del sistema base comercializado por Promega y añadir la secuencia que codifica para la proteína verde fluorescente (EGFP) bajo el control del promotor mínimo del gen *Arc/Arg3.1* (SARE-ArcMin) armado previamente. El plásmido construido se denomina FAGFP-Pmin. Se espera que ante actividad neuronal, las células transfectadas expresen EGFP y puedan ser cuantificadas.

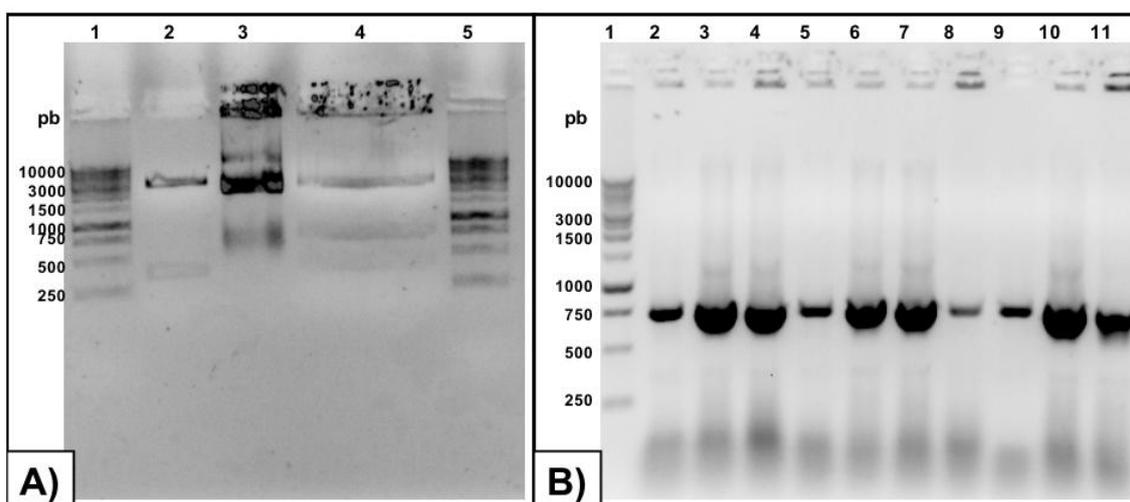
Se procedió a amplificar la secuencia codificante para la proteína EGFP con los cebadores diseñados para añadir los sitios de restricción de SgfI y PmeI usando ensayos de PCR y como molde el plásmido pEGFP-N1. En primera instancia se realizó un gradiente de temperaturas para seleccionar la óptima en la PCR (ver figura 16-A).



**Figura 16.-** Construcción del plásmido EGFPpjet. **A) 1:** Marcador de peso molecular. **3-10:** Productos obtenidos en los ensayos de PCR empleado gradientes de temperatura para amplificar la secuencia de EGFP (745 pb). **B) 1:** Marcador de peso molecular. **2-4:** Triplicado de una PCR utilizando los oligonucleótidos diseñados para amplificar EGFP, el producto fue purificado y clonado en el pJet1.2 (“EGFPpJet”).

Como se observa, el mayor nivel de amplificación se alcanzó a los 57.1 °C y se seleccionó esta temperatura como óptima para realizar por triplicado la amplificación con los

oligos GFP\_FW y GFP\_RV. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis (ver figura 15-B) y la banda correspondiente a la secuencia de EGFP se purificó del gel. Una vez purificada, la banda de EGFP se insertó en el vector pJet1.2 para facilitar su manejo. Posteriormente el plásmido recombinante se digirió con las enzimas PmeI y SgfI y el fragmento de 730 pb que contiene la secuencia que codifica para la EGFP fue purificado. Por otra parte el plásmido pF12A RM Flexi se digirió de la misma manera, y se desfosforiló para después ligarlo con el fragmento EGFP purificado. Las células competentes fueron transformadas con la mezcla de ligación y las clonas candidato se verificaron como portadoras del inserto mediante PCR de colonias (ver Figura 16-B). Todas las colonias probadas contienen el plásmido de interés y se seleccionó una de ellas para crecerla en medio líquido y obtener el plásmido denominado FA-GFP.

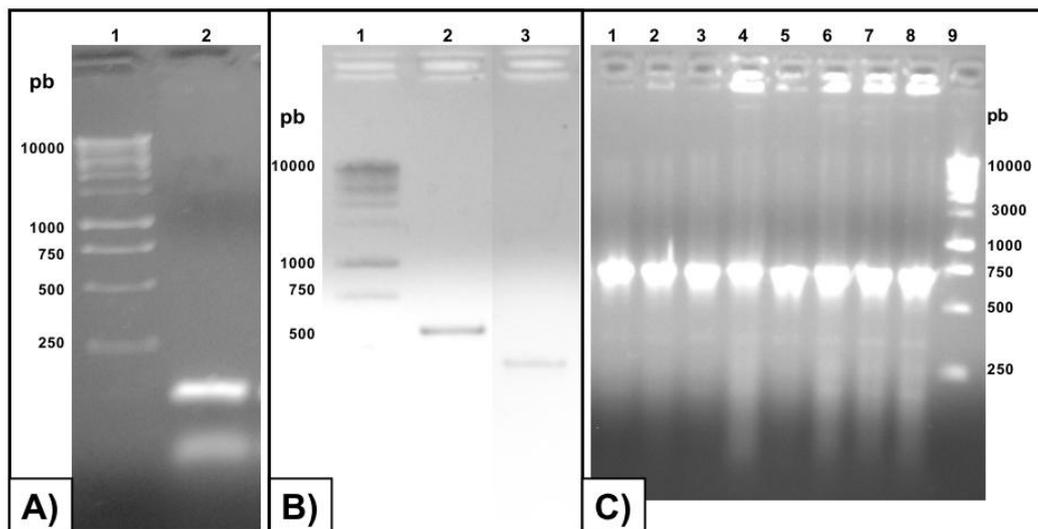


**Figura 17.-** Construcción del plásmido FA-GFP. **A) 1:** Marcador de peso molecular. **2:** Plásmido pF12A RM Flexi digerido con las enzimas SgfI y PmeI, se purificó la banda del plásmido (3130pb). **3:** Plásmido EGFPpJet sin digerir. **4:** EGFPpJet digerido con las enzimas SgfI y PmeI, se purificó la banda de 730pb correspondiente a EGFP y se ligó al vector pF12ARM. **B) 1:** Marcador de peso molecular. **2-11:** Productos de la PCR de colonias candidato portadoras del plásmido FA-GFP.

Para amplificar la secuencia promotora mínima del gen *Arc/Arg3.1* (ArcMin) de 402 pb, así como a su potenciador principal (SARE) de 108 pb (Kawashima et al., 2009), se empleó el plásmido amablemente provisto por el Dr. H. Okuno de la Universidad de Tokio, llamado pGL4.11-Arc7000-Venus-pest, se diseñaron los oligos manualmente verificando con alineamientos usando el software ClustalX 2.0.11 (Larkin et al., 2007) y se emplearon en

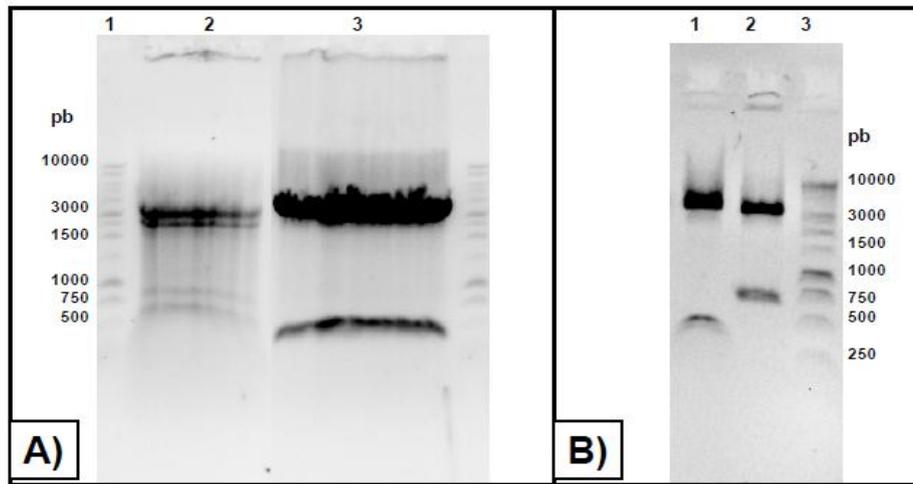
ensayos de PCR para amplificar las secuencias deseadas. Una vez visualizados en gel, se purificaron los productos de PCR con el kit de Zymo.

Los cebadores para ensamblar el promotor mínimo se diseñaron con complementariedad de bases entre las secuencias SARE y ArcMin, de tal manera que por ensayos de PCR se construyó un producto con la secuencia SARE y ArcMin unidas. El fragmento de DNA de 550 pb conteniendo ambas secuencias se denominó Pmin y se clonó en el vector pJet1.2 para facilitar su manejo, conformando el vector Pmin-pJet (ver Figura 18).



**Figura 18.-** Análisis de productos de PCR. **A) 1:** Marcador de peso molecular. **2:** Producto de PCR correspondiente al fragmento SARE (108pb). **B) 1:** Marcador de peso molecular. **2:** corresponde al producto de PCR del fragmento del promotor mínimo de Arc ("Pmin") de 550pb. **3:** fragmento ArcMin (402pb). **C) 1-8:** Producto de PCR de colonias candidato portadoras del plásmido Pmin-pJet. **9:** Marcador de peso molecular.

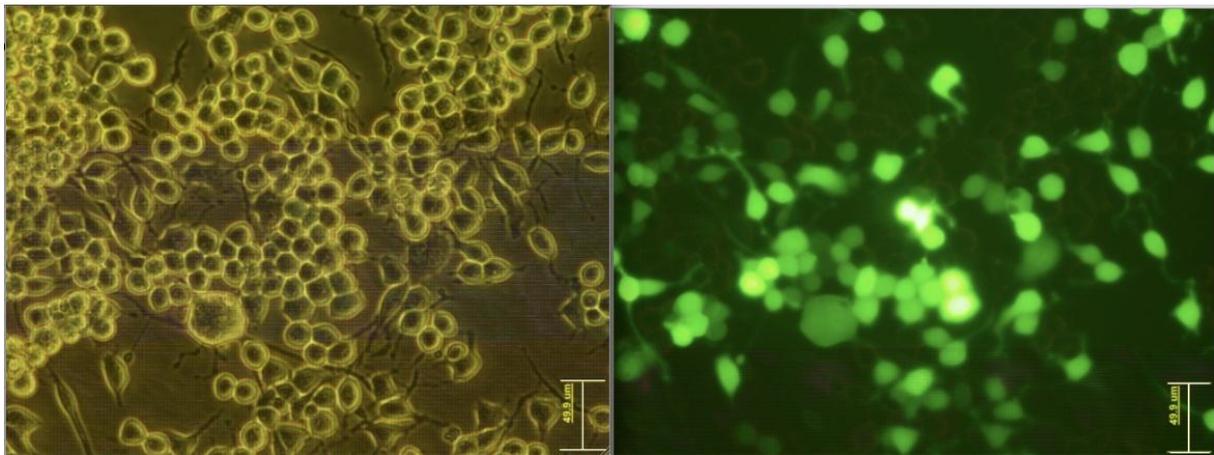
Una vez construido el promotor mínimo de Arc/Arg3.1 (Pmin), se procedió a construir un vector conteniendo este promotor y la secuencia codificante para la EGFP bajo su control. Para ello, los plásmidos FAGFP y Pmin-pJet fueron digeridos con las enzimas XhoI y HindIII y los productos de la digestión (3433 y 430 pb para FAGFP; 2702 y 841 pb para Pmin-pJet) fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa. Se purificaron los fragmentos que incluían al Pmin (841 pb) y el vector FAGFP sin su promotor viral (3.4 kb), se ligaron, se transformaron bacterias con la mezcla de ligación y se seleccionó una colonia candidato para verificar por patrón de restricción que portaba el plásmido recombinante de interés. El plásmido así construido se denominó FAGFP-Pmin (ver figuras 15 y 19).



**Figura 19.-** Construcción del plásmido FAGFP-Pmin. **A) 1:** Marcador de peso molecular. **2:** Plásmido Pmin-pjet digerido con las enzimas HindIII y XhoI; se purificó el fragmento de 841 pb. **3:** vector FAGFP digerido con las enzimas HindIII y XhoI; se purificó el fragmento de 3.4 kb. **B)** Patrón de digestión del vector FAGFP-Pmin digerido con **1:** NdeI y SacI, **2:** con SgfI y PmeI. **3:** Marcador de peso molecular.

### 8.3 De las pruebas en la línea neuronal

Una vez construido el vector FAGFP-Pmin se requería probar su funcionalidad en células de tipo neuronal. Para ello, con base en el artículo de Dickey y colaboradores (2004) se seleccionó la línea de Neuroblastoma 2A (N2A). En esta publicación se establece que la línea N2A presenta las ventajas de tener una alta eficiencia de transfección y de diferenciarse en un fenotipo neuronal que expresa genes de expresión inmediata temprana, incluyendo a *Arc/Arg3.1*. En particular, reportan que los niveles de ARN mensajero del gen *Arc/Arg3.1* endógeno incrementa casi al doble ante la inducción con el factor de crecimiento neural (NGF) a una concentración final de 100ng/ml durante 1 hr en cultivos de células N2A diferenciadas a neuronas a través de la administración de 1 mM de db-cAMP (por sus siglas en inglés: ‘dibutyryl cyclic adenosine monophosphate’) durante 72 hrs previas.



**Figura 20.-** Células N2A transfectadas con el plásmido control pEGFP-N1 a las cuales no se les indujo diferenciación. Fotografías tomadas con objetivo 20X a las 22 hrs post-transfección. **Izq:** cuerpos celulares iluminados con luz transmitida sin retirar el filtro de fluorescencia. **Der:** fluorescencia de las mismas células. La barra blanca indica 50 micras.

Para probar la actividad del promotor mínimo construido (Pmin), se evaluó la expresión de la proteína EGFP en células N2A diferenciadas y transfectadas con el vector FAGFP-Pmin, ante la aplicación el protocolo de inducción mencionado (Dickey et al., 2004). La primera etapa consistió en la estandarización del cultivo de la línea celular N2A y su transfección. Las células N2A adheridas no diferenciadas se transfectaron con Lipofectamina-LTX y se logró una eficiencia de transfección oscilando alrededor del 40% con el vector pEGFP-N1 al evaluar la expresión de EGFP a las 22 hrs post-transfección (ver figura 20). Además, un experimento piloto reveló que la fluorescencia de EGFP es identificada a partir

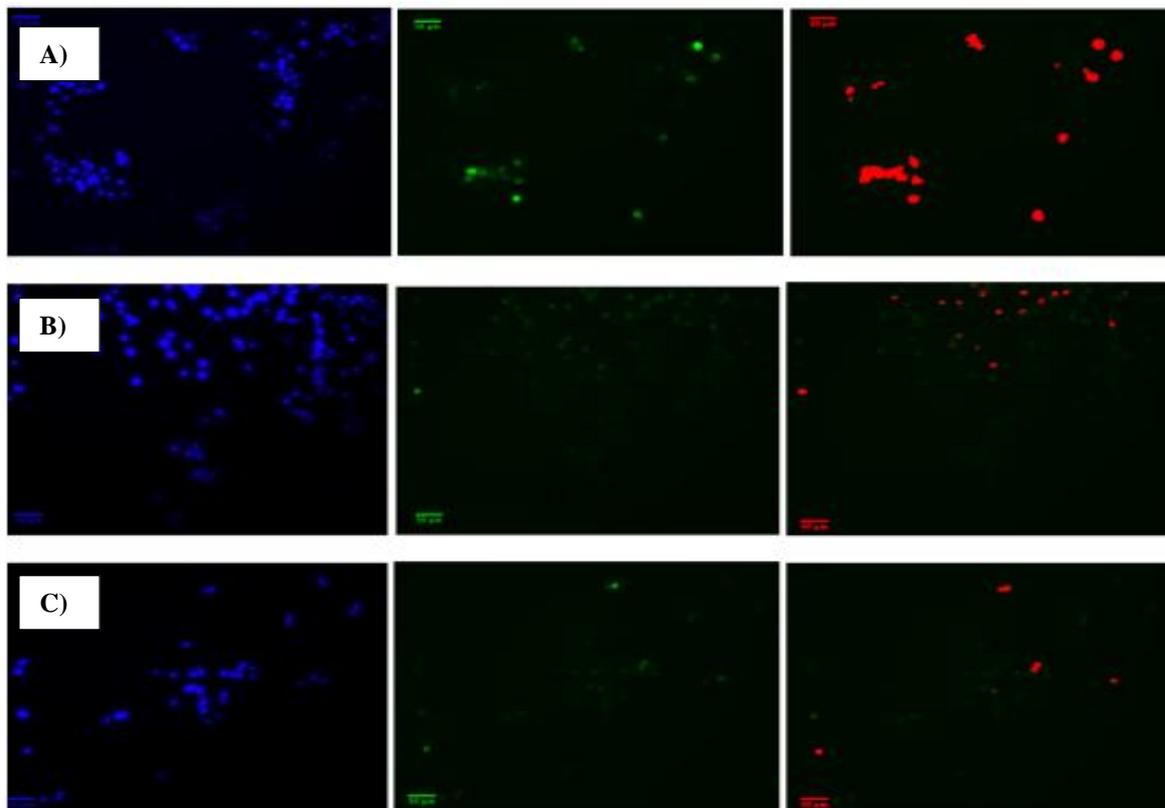
de las 5 hrs post-transfección, lo cual concuerda con Santos y colaboradores (2007). De manera que se procedió a evaluar la fluorescencia en estos dos tiempos, y a utilizar al vector EGFP-N1 en todos los experimentos como indicador de la eficiencia de transfección.

Se procedió a evaluar al promotor Pmin a través de la expresión de la proteína EGFP en células N2A transfectadas con el plásmido FAGFP-Pmin, cultivadas en medio de diferenciación con db-AMPC y posteriormente inducidas con NGF (100ng/ml). Como control negativo se evaluó la fluorescencia en células N2A que no fueron inducidas con NGF.

De manera que se evaluó la actividad del promotor mínimo mediante el conteo del número de células fluorescentes (gracias a la expresión de EGFP bajo su control) con respecto al total de células contadas identificadas mediante campo claro ó tinción nuclear con DAPI. Para dicho propósito se siguieron tres protocolos:

- 1) El protocolo #1 consistió en diferenciar a las células durante 40 hrs después de transfectar y antes de inducir durante 1 hr con NGF 100 ng/ml, para evaluar la cantidad de células fluorescentes respecto del total de células a las 6 hrs post-inducción.
- 2) El protocolo #2 consistió en transfectar a las células e inducir su diferenciación durante 65 hrs para después inducirlas durante 1hr con NGF 100 ng/ml, evaluando la cantidad de células fluorescentes con respecto al total de células contadas a las 22 hrs después de la transfección.
- 3) El protocolo #3 consistió en diferenciar durante 12 hrs a las células previamente transfectadas, y proceder a inducirlas con NGF 100 ng/ml en el medio de cultivo durante 22 hrs continuamente.

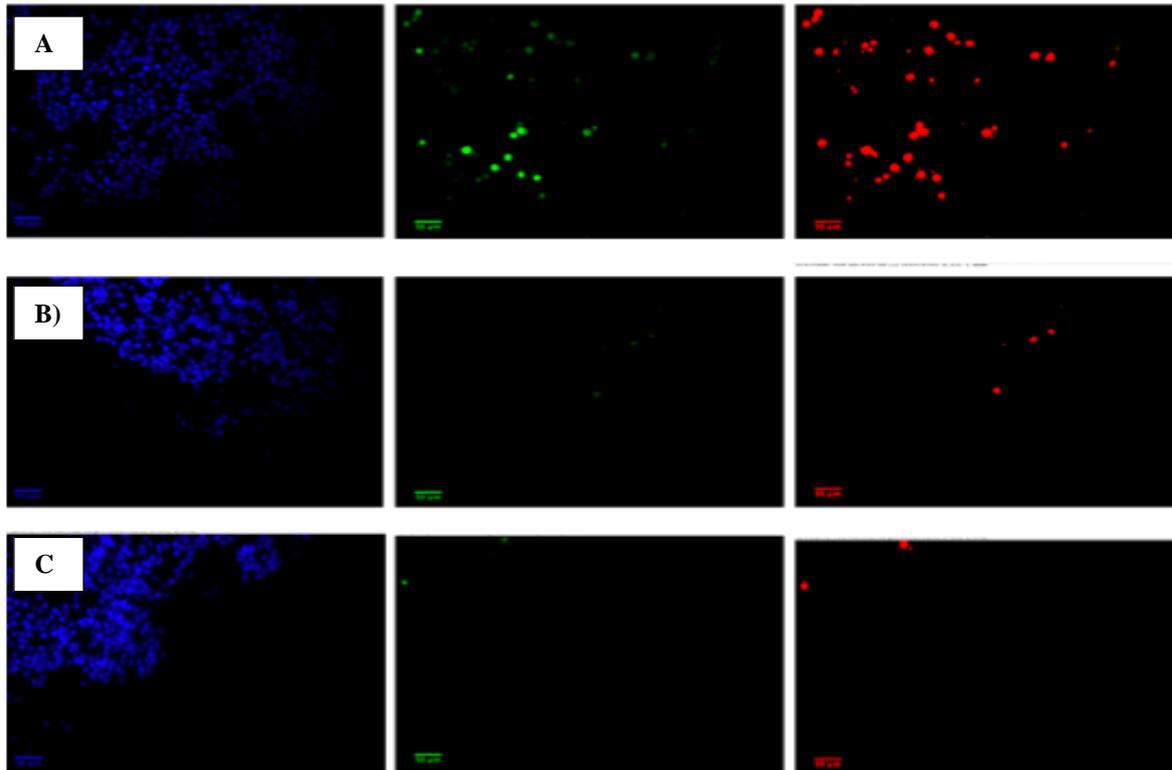
Siguiendo el protocolo #1, se realizaron tres experimentos en placas de 96 pozos (ver figura 21). Se graficó el promedio del porcentaje de células fluorescentes de los 3 experimentos (ver figura 24) y se apreció la expresión de EGFP en el  $3.13 \pm 0.86\%$  de las células totales inducidas con la administración de NGF.



**Figura 21.-** Protocolo #1: Células N2A diferenciadas durante 46 hrs. **A)** Transfectadas con el plásmido EGFP-N1. **B)** Transfectadas con el plásmido FAGFP-Pmin e inducidas con NGF durante 1hr. **C)** Transfectadas con el plásmido FAGFP-Pmin, sin tratamiento. Fotografías tomadas con objetivo 20X a las 6 hrs después de haber añadido NGF. **Izq:** núcleos celulares teñidos con DAPI. **Centro:** fluorescencia de las mismas células. **Der:** en rojo la fluorescencia sobre el umbral determinado. La barra indica 50 micras.

En comparación, se expresó la proteína EGFP en el  $1.63 \pm 0.82\%$  de las células totales sin inducir. Además, se realizó un experimento acorde al protocolo #2 (ver figura 22), el cual reveló un mayor porcentaje ( $3.12\%$ ) de células EGFP-positivas (EGFP(+)) en las células tratadas con NGF que en las células no tratadas ( $0.94\%$ ) (ver figura 24).

Por otro lado, siguiendo el protocolo #3 se realizaron tres experimentos para contrastar dichos datos con los obtenidos ante una sola oleada de inducción (ver figura 23). Resultó congruente que después de cultivar en medio de diferenciación durante 12 hrs, el promedio de células expresando EGFP al ser tratadas continuamente con NGF ( $10.65 \pm 4.99\%$ ) fuera mayor al de la condición de no tratamiento ( $4.12 \pm 3.34\%$ ) (ver figura 24).

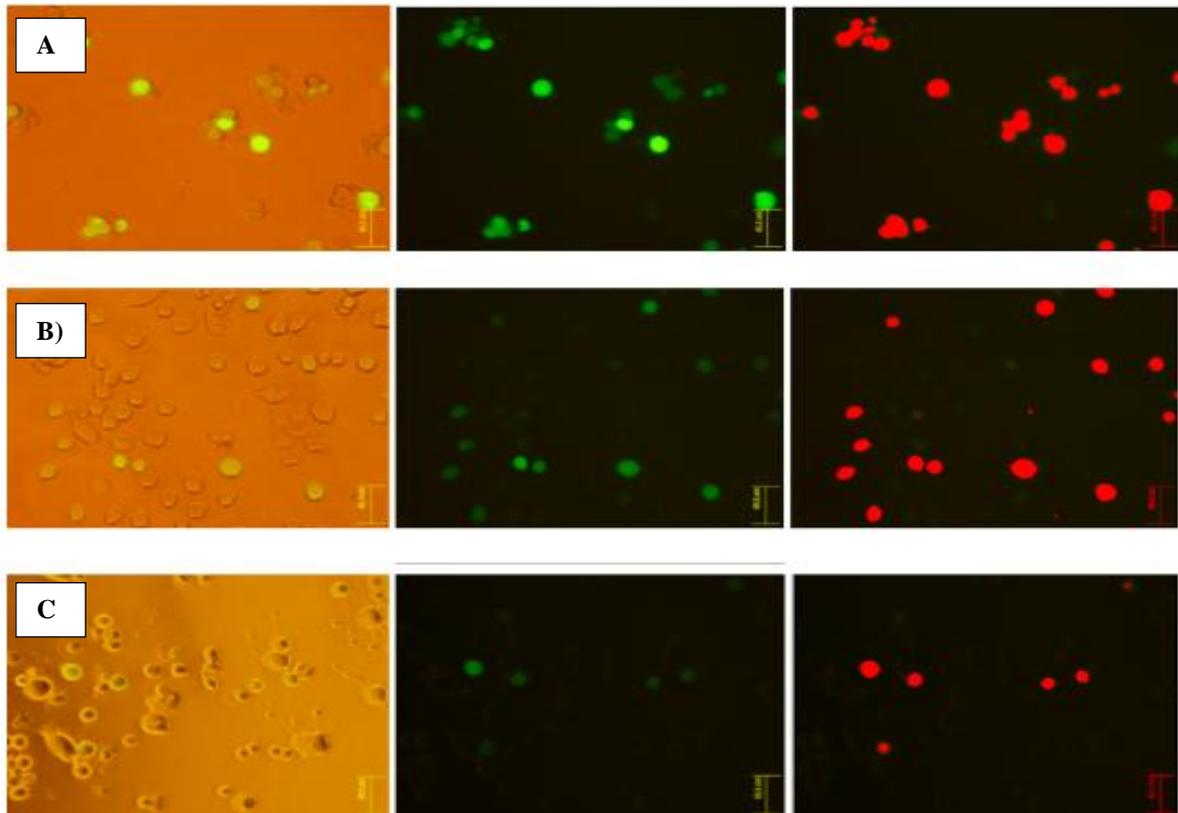


**Figura 22.-** Protocolo #2: Células N2A diferenciadas durante 87 hrs y tratadas durante 1 hr. **A)** Transfectadas con el plásmido EGFP-N1. **B)** Transfectadas con el plásmido FAGFP-Pmin e inducidas con NGF **C)** Transfectadas con el plásmido FAGFP-Pmin, sin tratamiento. Fotografías tomadas con objetivo 20X a las 22 hrs después de haber añadido NGF. **Izq:** núcleos celulares teñidos con DAPI. **Centro:** fluorescencia de las mismas células. **Der:** en rojo la fluorescencia sobre el umbral determinado. La barra indica 50 micras.

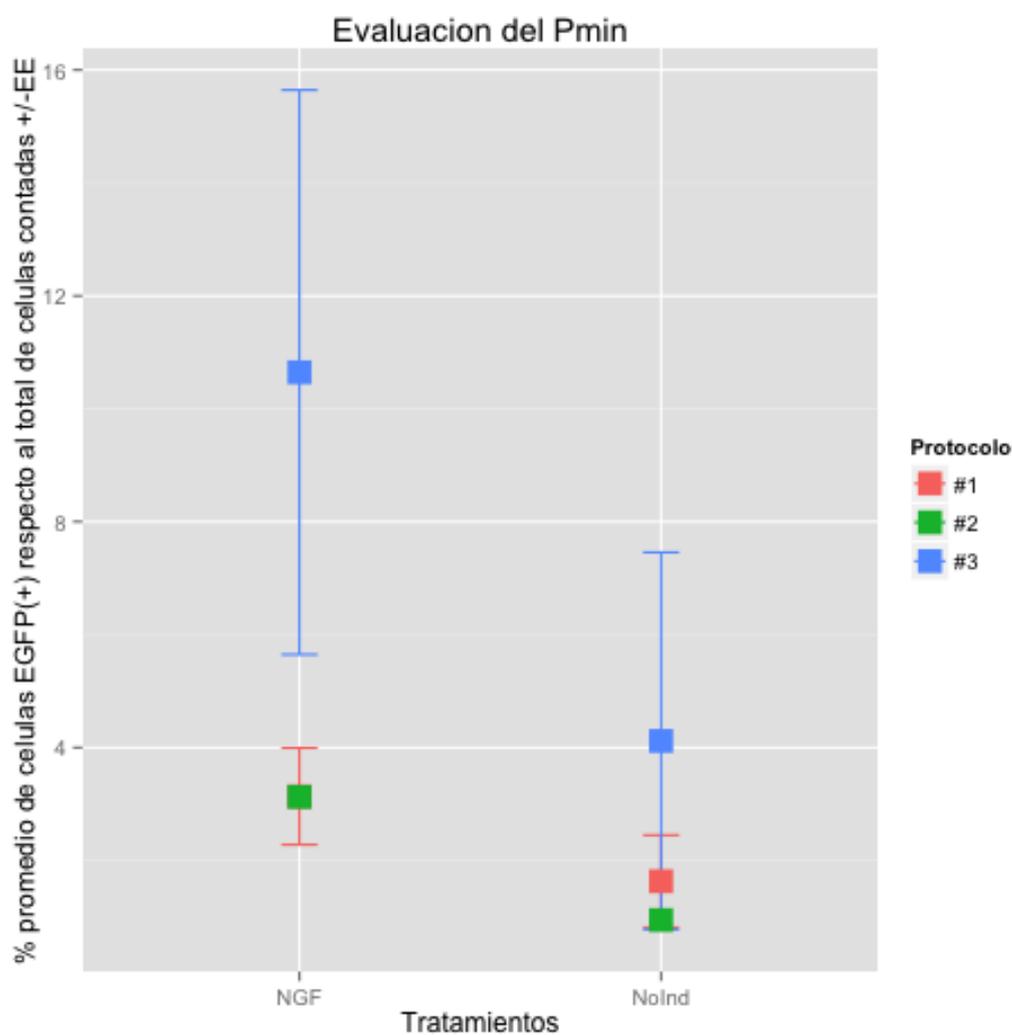
El cambio en la expresión de EGFP como porcentaje de la expresión basal fue calculado al normalizar por cada experimento, el porcentaje de células fluorescentes tratadas con NGF con respecto al porcentaje de células fluorescentes en su control de células no tratadas con NGF (ver Material Anexo). De manera que el promedio de estos porcentajes normalizados de células EGFP(+) habiendo seguido los protocolos #1, #2 y #3 fue del  $156.41 \pm 6.82\%$ ,  $331.91\%$  y  $618.64 \pm 226.21\%$  respectivamente (ver figura 25).

Se realizó un análisis de varianza (prueba T-student) para evaluar si existen diferencias significativas entre la media del porcentaje de inducción en las células tratadas con NGF con respecto a la media de inducción de las no tratadas (100%). Para el caso del Protocolo #2 no se pueden efectuar comparaciones estadísticas del efecto del NGF dado que solo se cuenta con un experimento. Los resultados de la prueba T-student revelaron que bajo un umbral alpha de 0.05 si existen diferencias significativas en la inducción causada por la inducción con NGF siguiendo el Protocolo #1 (p-valor de 0.007041), pero no a partir de los resultados

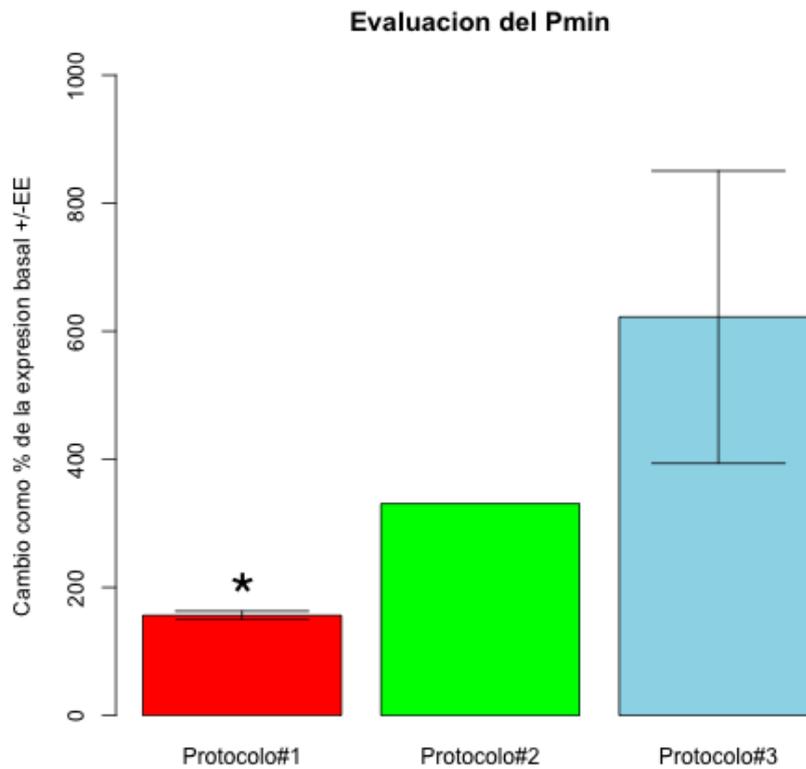
del Protocolo #3 (p-valor de 0.07472). Dichos resultados indican que el tratamiento de inducción con NGF durante 1 hr está induciendo la actividad del promotor Pmin ensamblado en el presente trabajo y por lo tanto la sobreexpresión de la proteína EGFP en los cultivos de células N2A diferenciadas a fenotipo neuronal.



**Figura 23.-** Protocolo #3: Células N2A diferenciadas durante 36 hrs. **A)** Transfectadas con el plásmido EGFP-N1. **B)** Transfectadas con el plásmido FAGFP-Pmin e inducidas con NGF durante 22 hr. **C)** Transfectadas con el plásmido FAGFP-Pmin, y sin inducir con NGF. Fotografías tomadas con objetivo 20X a las 22 hrs después de haber comenzado la estimulación con NGF. **Izq:** cuerpos celulares iluminados con luz transmitida sin retirar el filtro de fluorescencia. **Centro:** fluorescencia de las mismas células. **Der:** en rojo la fluorescencia sobre el umbral determinado. La barra indica 50 micras.



**Figura 24.-** Porcentaje promedio y error estándar (EE) de células transfectadas con el vector FAGFP-Pmin expresando EGFP (EGFP(+)) ante los distintos tratamientos: diferenciadas previamente e inducidas con 100ng/ml del factor de crecimiento neural ('NGF'), ó sin tratar ('NoInd'). Los protocolos de inducción consistieron ya sea en aplicar el tratamiento con NGF durante 1 hr y evaluando a las células fluorescentes a las 6 (Protocolo #1) y a las 22 hrs después de la inducción (Protocolo #2), ó bien en aplicar el tratamiento durante 20-22 hrs (Protocolo #3). En cada protocolo se advierte que el porcentaje de células EGFP(+) en las células tratadas con NGF es siempre mayor al de las no tratadas.



**Figura 25.-** Media y error estándar (EE) de la inducción ante cada tratamiento mencionado, mostrado como porcentaje de la proporción de células EGFP(+) de las células no tratadas, consideradas como la expresión basal (100%) dada por el promotor Pmin. En el eje de las abscisas se indican los tratamientos: inducción con NGF 100ng/ml (NGF). Se indica el protocolo experimental al que corresponde cada barra en la gráfica: tratamiento durante 1 hr evaluando a las células fluorescentes a las 6 hrs (Protocolo #1), tratamiento durante 1 hr evaluando a las células fluorescentes 22 hrs después de la inducción (Protocolo #2), tratamiento continuo durante 22 hrs (Protocolo #3). El asterisco indica diferencias significativas entre las células tratadas con NGF y las no tratadas ( $P < 0.05$ ).

## 9. DISCUSIÓN

La implementación de un método que permita marcar la actividad neuronal sería sin duda de gran utilidad, sin embargo, estrategias como las aquí propuestas requieren de controlar muchas variables para validar el sistema. Es por ello que el desarrollo del ratón transgénico propuesto es un proyecto amplio que abarcará más tiempo y esfuerzo para lograrse.

Hasta ahora se ha propuesto el diseño de un sistema de regulación génica cuyas dinámicas moleculares prometen ser adecuadas para lograr el cometido de activar y detener una ventana de marcado en el menor tiempo posible. Se ha modelado la cinética de las moléculas involucradas en base a los datos disponibles en la literatura, y la simulación del sistema arrojó una ventana óptima para apagar y encender el sistema de marcado en 20 min. Sin embargo, los parámetros clave aún faltan por esclarecerse experimentalmente, como lo son la eficiencia del promotor de *Arc/Arg3.1* y las concentraciones de los antibióticos que podrían utilizarse sin afectar la actividad neuronal del organismo.

Al respecto de la concentración de los antibióticos que resultaría inocuo para el sistema, se ha evaluado que existe un rango amplio de la concentración de Coumermicina que no altera la respuesta neuronal, y en el presente trabajo se propone que la Novobiocina en la concentración recomendada para los ensayos *in vitro*, tampoco representa un riesgo que altere la actividad neuronal en sí misma. Por lo tanto, ambos antibióticos se muestran viables para regular el sistema.

Se han realizado también avances en la construcción del sistema de regulación génica, como lo es la construcción del promotor y potenciador mínimos de *Arc/Arg3.1*. Y se ha probado su actividad mediante la expresión de un reportero fluorescente en células N2A transfectadas con el constructo. Los resultados de dicha evaluación sugieren que el promotor construido es funcional y recapitula el patrón de expresión del gen *Arc/Arg3.1*.

## 9.1 De la evaluación del efecto de la Novobiocina

Como se planteó en el primer objetivo, fue necesario concluir los estudios previos para determinar si los antibióticos reguladores del ‘Regulated Mammalian Expression System’ (Zhao et al., 2003), alteran la actividad en el hipocampo de rebanadas de cerebro de ratón. Según el Manual de Promega para este sistema de regulación, las concentraciones de Coumermicina-A1 recomendadas para el “encendido” del sistema de regulación génica abarcan desde 0.5 nM hasta 50 nM dependiendo de la proporción de plásmidos transfectados y del tipo celular. Además, dicho manual indica que las concentraciones de Novobiocina que frenan el sistema eficientemente oscilan en un orden de magnitud arriba de la concentración utilizada de Coumermicina-A1. Específicamente, se sugiere que 5 nM de Coumermicina-A1 y 2.5  $\mu$ M de Novobiocina funcionan para inducir y frenar, respectivamente, la transcripción de un transgen regulado al utilizar cultivos de células transfectadas estables de mamífero (Manual de Promega para producto C9470).

Con la elaboración de un experimento piloto, ya se conocía que el antibiótico inductor del sistema, Coumermicina-A1, a una concentración de 5  $\mu$ M (un orden de magnitud por arriba de lo indicado para inducir al sistema), no surte efecto en la actividad registrada durante 20 min. Sin embargo, la Novobiocina a una concentración de 2.5 mM causó un aumento en la actividad hasta convertirse en actividad paroxística (ver figura 7). Es por ello que se procedió a evaluar concentraciones de Novobiocina alrededor de la necesaria para frenar eficientemente la transcripción del transgen regulado (2.5  $\mu$ M).

La actividad espontánea de las neuronas de la región hipocampal CA1 en rebanadas del cerebro de ratón se analizó con la administración de diferentes concentraciones del antibiótico regulador Novobiocina (1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M y 10  $\mu$ M). Los resultados indicaron que la actividad espontánea no se modifica significativamente durante la administración de cada una de las concentraciones de Novobiocina probadas.

Por lo tanto se establece como rango (1-10  $\mu$ M) que resulta inocuo. Considerando los reportes de experimentos *in vitro*, la concentración de Novobiocina que se planea utilizar para quebrantar los dímeros de la proteína quimérica transactivadora y así impedir el marcado de neuronas activadas después de la administración de este antibiótico es de 2.5  $\mu$ M. Acorde a

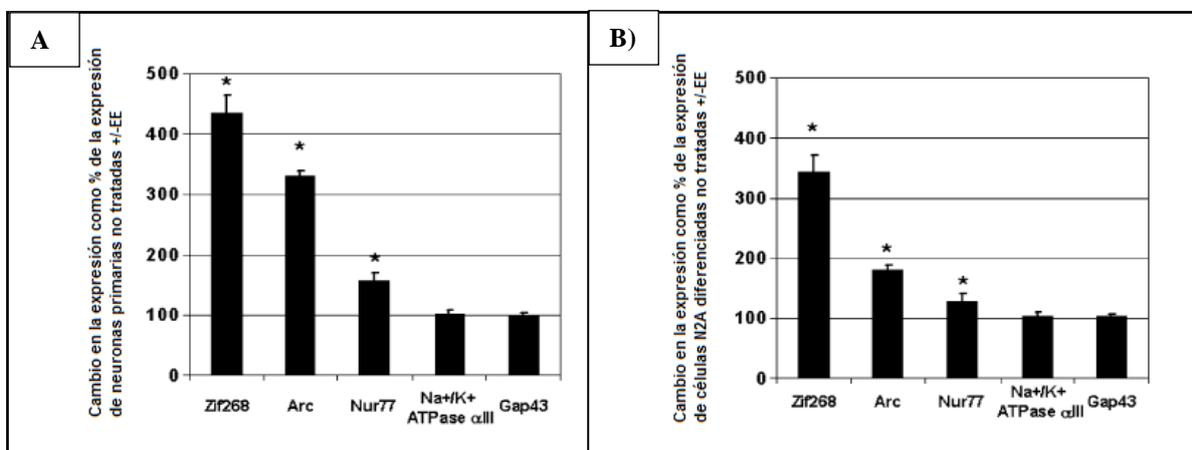
los resultados del presente trabajo se puede establecer que esta concentración no alterará la actividad neuronal del cerebro del ratón transgénico a desarrollar y por lo tanto es viable utilizar el sistema propuesto para controlar la expresión génica con los antibióticos Coumermicina-A1 y Novobiocina.

Sin embargo, el que no ocurra una alteración significativa de la actividad espontánea en CA1 no asegura que los procesos de aprendizaje y memoria no se vean afectados por la administración de los antibióticos reguladores. Por lo tanto, sería conveniente continuar las evaluaciones implementando un protocolo que evalúe la capacidad de la rebanada para inducir LTP ante la presencia de los antibióticos en las concentraciones a utilizar. Así mismo, evaluaciones conductuales en ratones a los cuales se haya administrado los antibióticos intracerebroventricularmente resultan indispensables para validar el uso de la Novobiocina y la Coumermicina como reguladores del sistema propuesto para el ratón transgénico que se busca construir.

## 9.2 De la evaluación del promotor mínimo

Se probó la inducción de la transcripción de EGFP llevada por el pMin al transfectar este nuevo plásmido (FAGFP-Pmin) en cultivos neuronales inducidos con 100ng/ml de NGF, lo cual acorde a reportes en la literatura (Dickey et al., 2004) promueve un aumento en la cantidad de ARN mensajero de *Arc/Arg3.1* a casi el doble de la expresión basal en células N2A diferenciadas previamente con db-cAMP durante 72 hrs.

En la publicación de Dickey y colaboradores (2004) las diferencias en la inducción de las células diferenciadas tratadas con NGF o sin tratamiento fueron comparadas mediante ANOVA de una vía. Reportaron el promedio de tres experimentos independientes para dos tipos celulares: cultivo primario neuronal y células N2A. Cada uno de los experimentos consistió a su vez de tres réplicas (pozos) por tratamiento. Demostraron que el tratamiento con NGF induce una rápida y significativa sobreexpresión de los IEGs *Zif268*, *Arc/Arg3.1* y *Nur77*, pero no del gen *Gap43*, cuya proteína se relaciona con el crecimiento axonal y plasticidad, ni del gen que codifica para la subunidad  $\alpha$ III de la ATP-asa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , de los cuales no se esperaba una sobre-expresión ante una hr de estimulación debido precisamente a que no son IEGs (ver figura 26).



**Figura 26.-** Figura modificada de Dickey et al., 2004. Media y error estándar (EE) de la inducción de la expresión de IEGs ante la exposición a NGF durante 1 hr. La expresión diferencial de los genes sobreexpresados se presenta como porcentaje de la expresión en las células no tratadas con NGF. **A)** En cultivos primarios de neuronas de rata se sobre-expresan los genes de expresión inmediata temprana (IEGs) *Zif268*, *Arc/Arg3.1* y *Nur77*, pero no los genes relacionados con plasticidad *gap43* y la subunidad  $\alpha$ III de la ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . **B)** En cultivos de células N2A diferenciadas también se sobre-expresan los genes de expresión inmediata temprana (IEGs) *Zif268*, *Arc/Arg3.1* y *Nur77*, pero no los genes relacionados con plasticidad *Gap43* y la subunidad  $\alpha$ III de la ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . Los asteriscos indican diferencias significativas entre las células tratadas con NGF y las no tratadas ( $P < 0.05$ ).

En la presente tesis, habiendo cuantificado el número de células fluorescentes a las 6 hrs después de inducir durante 1 hr con NGF en tres experimentos independientes de cultivos celulares previamente transfectados con el vector FAGFP-Pmin y diferenciadas durante 40 hrs (Protocolo #1), se demostró que el número de células que expresan EGFP ante la inducción de 1 hr con NGF aumentó prácticamente la mitad ( $156.41 \pm 6.82\%$ ) a las 6hrs con respecto a las células no inducidas (100%).

Por otro lado, al estimular durante 1 hr con NGF y evaluar a las 22 hrs post-tratamiento (Protocolo #2) se observó que la expresión aumentó al triple (331.91%) en un solo experimento. Dichos resultados concuerdan con el panorama previsto, en donde el NGF induce la expresión de *Arc/Arg3.1* al administrarse durante 1 hr y por lo tanto se induce la expresión de EGFP bajo el control del promotor mínimo de *Arc/Arg3.1* ensamblado en el presente trabajo. La mayor proporción de células fluorescentes vistas a las 22 hrs en comparación a las vistas a las 6 hrs post-inducción con NGF denota la mayor acumulación de proteína verde fluorescente a partir del incremento de su RNA mensajero que se propone ocurrió durante la oleada de transcripción inducida por el tratamiento con NGF durante 1 hr.

En los otros experimentos donde se siguió el protocolo de tratamiento continuo con NGF durante 22 hrs (Protocolo #3) se observó un aumento en el contraste de la inducción de la expresión de EGFP entre las células tratadas y no tratadas. Ante la estimulación continua con NGF se tuvo un aumento del  $618.64 \pm 226.21\%$  con respecto a la expresión basal (100%), lo que evidencia la inducibilidad del promotor ante la inducción continua con NGF 100 ng/ml.

En conjunto, estos experimentos sugieren que el promotor Pmin está respondiendo a la inducción con NGF. Sin embargo, se hace énfasis en que si el NGF indujese la expresión de la EGFP dirigida por el promotor Pmin en todas las células transfectadas se esperaría alrededor del 40% de células fluorescentes considerando el control de transfección, y sin embargo las proporciones se mantienen por debajo del 10% (ver figura 24). Dichas proporciones bajas podrían ser el resultado tanto de una mala eficiencia del tratamiento con NGF, como de una baja respuesta del promotor Pmin ensamblado, lo cual podría discernirse al evaluar la expresión del *Arc/Arg3.1* endógena, pero por el momento permanece la duda y por lo tanto se deben considerar los datos con cautela.

Además, la variación de la proporción de células EGFP(+) en los 3 experimentos que conforman cada protocolo resulta considerable sobre todo en el caso del Protocolo #3, tal como se refleja en la dispersión del porcentaje de cambio ante la inducción normalizado respecto a la expresión basal (ver figuras 24 y 25). De esta manera, no se puede confiar que el tratamiento con NGF induce la expresión de forma significativa respecto al control sin tratamiento con NGF. Es por ello que se propone aumentar el número de experimentos para disminuir la variabilidad y esclarecer las proporciones de inducción ante la estimulación con NGF.

A pesar de ello, de manera preliminar estos resultados permiten ser optimistas acerca de la funcionalidad del promotor mínimo construido, ya que se esperaba poder inducir la expresión de EGFP bajo el Pmin al inducir con NGF 100 ng/ml durante 1hr, acorde al reporte del aumento en la transcripción del gen *Arc/Arg3.1* casi al doble mediante la cuantificación con PCR semicuantitativa (Dickey et. al, 2004). Dadas las observaciones de la expresión de EGFP en un mayor número de células ante el tratamiento con NGF en comparación a las células sin tratar, los resultados sugieren que el Pmin construido es capaz de recapitular la expresión conferida por el promotor completo del gen *Arc/Arg3.1* ante el protocolo de inducción establecido por Dickey y colaboradores (2004).

Al respecto de la inducción de la actividad del promotor de *Arc/Arg3.1* mediante el tratamiento con NGF, en el trabajo de Dickey y colaboradores (2004) se discute la manera en la que el NGF pudiese estar regulando la expresión de IEGs como *Arc/Arg3.1* y *Zif268*. Proponen que el NGF estaría activando cascadas de señalización como la de ERK1/2 mediante receptores de NGF (TrkA ó p75) que conllevarían a la modificación en la expresión génica y la subsecuente regulación de la plasticidad neuronal (Dickey et al., 2004). A pesar de que existe un reporte que asevera que las células de la línea N2A únicamente expresan el receptor p75 y no el TrkA (Evangelopoulos et al., 2004), posteriormente se ha descrito que las células N2A expresan receptores p75 y TrkA en una proporción de 100:1 y que esta estequiometría es similar a la observada en células PC12 (Ingraham et al., 2011).

En cuanto a la manera en que estos receptores están regulando la expresión de *Arc/Arg3.1*, se pueden entonces considerar los estudios realizados en células PC12 (células de feocromocitoma que expresan TrkA y p75) y en células PCNA (células de fibroblastos que

expresan al receptor p75 pero no al TrkA), donde se observó que todos los miembros de la familia de las neurotrofinas (NGF, BDNF, NT-3 y NT-4), mediante la activación de p75, resultan en la activación de ERK1/2 sin requerir la activación de la proteína cinasa de serina/treonina Raf que participa en la conocida cascada de señalización Ras-Raf-MEK-ERK (Lad y Neet, 2003). Esto es relevante ya que se ha reportado que ERK1/2 activa a la cinasa intermediaria MSK1 la cual activa posteriormente al factor de transcripción CREB, el cual es una de las proteínas importantes para activar la transcripción de genes necesarios para iniciar el desarrollo de neuritas en varios tipos de células neuronales (Bromberg et al., 2008; Ma'ayan et al., 2009). Y como se mencionó anteriormente, se ha observado (Kawashima et al., 2009) que en neuronas hipocámpales, CREB induce la transcripción de *Arc/Arg3.1* al unirse a su sitio responsivo CRE localizado en el potenciador denominado SARE. Por otro lado, se ha probado directamente el papel crucial de MSK1 en la regulación a la baja de *Arc/Arg3.1* ante privación de actividad neuronal al tratar cultivos de neuronas hipocámpales con TTX durante 24 hrs. También se sugiere que la inducción de *Arc/Arg3.1* causada por la activación de los receptores TrkB por BDNF ocurre gracias a la activación de MSK1 que a su vez fosforila a CREB y a la histona H3 (Corrêa et al., 2012).

Por otro lado, en células PC12 se ha reportado que el receptor a neurotrofinas TrkA – al ser activado por NGF e internalizado en endosomas – induce el crecimiento de neuritas (Grimes et al., 1996; Zhang et al., 2000). Sin embargo, en las células N2A la privación de suero es suficiente para inducir el crecimiento de neuritas mediante el incremento en la fosforilación del receptor EGFR (por sus siglas en inglés: ‘Epidermal Growth Factor Receptor’) que a su vez es necesaria para la fosforilación de las proteínas ERK1/2 y Akt, así como mediante la participación del factor de transcripción *Zif268* que está bajo el control de las cascadas de señalización Ras-Raf-MEK-ERK y PI3K-Akt (Cortés-Canteli et al., 2002; Evangelopoulos et al., 2005; Pignatelli et al., 1999).

En el presente trabajo, se propone que ante la adición de NGF se activan los receptores p75 y se estaría sobre-induciendo la expresión de *Arc/Arg3.1* –y por lo tanto también de EGFP bajo el Pmin– mediante una cascada de señalización que si bien no involucra a Ras y Raf como en el caso de la cascada para la diferenciación a fenotipo neuronal, sí converge en la activación de la cinasa-cinasa activada por mitógenos (MEK) y por lo tanto en la

fosforilación de ERK1/2 (Lad y Neet, 2003) que desembocaría en la fosforilación de CREB y su subsecuente acción como factor transcripcional sobre la secuencia SARE contenida en el promotor Pmin construido (Kawashima et al., 2009).

Sin embargo, prevalece la necesidad de cautela con respecto a la cascada de señalización sugerida, debido a que las partes de dicha secuencia de activación molecular se proponen a partir de observaciones realizadas en otros tipos neuronales, y por lo tanto existe incertidumbre de si es posible que se desemboque la cascada de señalización propuesta a partir de la activación de los receptores p75 en las células N2A tratadas con NGF. Esto debido a que se ha reportado que el efecto de la activación de ERK1/2 a partir de la activación de los receptores p75 en la sobrevivencia celular es dependiente del tipo celular (Lad y Neet, 2003). Precisamente en relación con las especificidades de la línea neuronal, Waltereit y colaboradores (2001) reportaron que la elevación de cAMP intracelular causada por forskolina induce a Arc/Arg3.1 en la línea PC12 (en una manera dependiente de la cascada de señalización de la PKA y de ERK1/2) pero no es suficiente para inducir a Arc/Arg3.1 ni en células N2A ni en células de fibroblastos NIH3T3. Este resultado es también confirmado indirectamente por Dickey y colaboradores (2004), quienes reportan que no ocurren cambios en la transcripción de Arc/Arg3.1 al inducir la diferenciación con db-AMPC durante 72 hrs.

Aunado a las posibles variantes en los elementos de la cascada de señalización propuesta que estén disponibles en las neuronas dependiendo del tipo celular en cuestión, se tiene otra interrogante crucial en cuanto a la manera en que el tratamiento con NGF está induciendo la sobre-expresión de EGFP bajo la supuesta inducción de la actividad del promotor mínimo de *Arc/Arg3.1* –Pmin–, una interrogante relacionada con la activación del potenciador SARE. Se ha demostrado que la activación de SARE por 4AP/BIC depende principalmente del flujo de calcio mediante receptores NMDA, resultando también importante la actividad de la cinasa dependiente de calcio/calmodulina (CaMK) y MEK, lo que confirma su inducibilidad por inputs sinápticos excitatorios (Kawashima et al., 2009). Sin embargo, dado que las células N2A no expresan receptores NMDA (LePage et al., 2005), podría ser que la activación de p75 no desemboque en la activación de la secuencia potenciadora SARE.

La interrogante de si el efecto inductor del NGF en la línea N2A está teniendo efecto sobre alguno de los elementos responsivos contenidos en la secuencia de SARE, resulta

sumamente compleja debido a que la transcripción de *Arc/Arg3.1* es regulada por medio de la integración de múltiples cascadas de señalización, y esto resulta precisamente en que tanto los niveles como la distribución de la expresión de *Arc/Arg3.1* sean particularmente sensibles a los cambios en la actividad sináptica (Lyons y West., 2011). Para intentar responder esta cuestión, cabe mencionar que a pesar de que la secuencia SARE actúa como el elemento principal que permite que la inducción de *Arc/Arg3.1* sea dependiente de actividad, otros elementos proximales también juegan cartas en el asunto. En particular, la región proximal del promotor confiere por sí misma un aumento en la actividad de luciferasa de 2 a 3 veces en cultivos de neuronas corticales ante estimulación con 4AP/BIC durante 4hrs en comparación a neuronas tratadas con TTX, el cual se considera un aumento dependiente de la contribución de las vías de cAMP y MAPK (Kawashima et al., 2009).

Aunado a esto, resulta interesante que a pesar de que la estimulación con cAMP en células N2A activa a CREB, y este a su vez induce la expresión del gen responsivo *c-Fos* en células PC12 (Gonzalez y Montminy, 1989), la estimulación con cAMP no induce a *Arc/Arg3.1* en células N2A (Waltereit et al., 2001). Además, el modesto aumento (2 a 3 veces) en la activación de *Arc/Arg3.1* conferido por la región proximal de su promotor (Kawashima et al., 2009) es similar al aumento en la producción de RNA mensajero de *Arc/Arg3.1* (al doble) desencadenado por la adición de NGF a las células N2A diferenciadas a fenotipo neuronal (Dickey et al., 2004), de manera que los resultados de Waltereit y colaboradores (2001) llevan a considerar que la secuencia potenciadora SARE (conteniendo un sitio CRE) no está siendo activada en esta línea neuronal, y que la cascada de señalización que induce la expresión de *Arc/Arg3.1* en otros tipos celulares como PC12, no se activa en las células N2A (Waltereit et al., 2001).

Es por ello que una de las propuestas de este trabajo para futuros avances en el proyecto es evaluar el promotor Pmin en otra línea neuronal donde se haya reportado una estimulación que notoriamente induzca la expresión de *Arc/Arg3.1*, como en los trabajos mencionados anteriormente utilizando la línea PC12 y la SH-SY5Y (Soulé et al., 2012; Waltereit et al., 2001). Otro ejemplo son los cultivos corticales, en donde se ha demostrado que al infectar estas células con un lentivirus acarreando el constructo SARE-ArcMin controlando la expresión de EGFP y estimular ya sea con 4AP/BIC ó con BDNF aumenta la

fluorescencia en el soma de neuronas individuales (Kawashima et al., 2009). Además, se podrían utilizar cultivos hipocampales y estimulación eléctrica, ya que se ha visto que al transfectar con el vector Arc7000-ELuc-PEST se detecta un aumento inmediato de más de 100 veces en la fluorescencia a partir de la estimulación eléctrica (9 trenes de 100 Hz durando 1 seg), aumento el cual alcanza la saturación entre 4 y 6 hrs después y coincide con el patrón de activación del gen *Arc/Arg3.1* después de estimulación eléctrica *in vivo* (Kawashima et al., 2009; Wallace et al., 1998).

En conclusión, la producción de proteína EGFP en los cultivos de células N2A concuerda con el efecto inductor que se supone ejerce el NGF sobre el promotor Pmin ensamblado, dado el reporte de la inducción de *Arc/Arg3.1* en células N2A ante el mismo protocolo de inducción utilizado por Dickey y colaboradores, 2004. Es evidente que se requiere replicar y ampliar estos experimentos para elaborar conclusiones válidas. En lo que concierne a los resultados de la funcionalidad del Pmin en este trabajo, cabe mencionar que la inducción utilizada resulta en cierta manera inespecífica al tratarse NGF de una neurotropina endógena, y por lo tanto sería ideal corroborar estos resultados con la administración de un inductor más selectivo (como agonistas colinérgicos ó glutamatérgicos), que se espere active la cascada de señalización que ultimadamente conllevaría a la expresión del gen *Arc/Arg3.1* en esta u otra línea de tipo neuronal. No obstante, estos experimentos sugieren que el promotor Pmin si está respondiendo a la inducción con NGF.

## 10. CONCLUSIONES

Como parte del primer objetivo planteado en el presente trabajo, se evaluó el efecto de tres concentraciones de Novobiocina (1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ ) sobre la actividad poblacional espontánea de la región CA1 hipocampal de rebanadas de cerebro de ratón. Las comparaciones con respecto a la actividad basal indican que dichas concentraciones de Novobiocina no alteran significativamente la actividad poblacional espontánea de la región CA1 hipocampal, y es así que se establece como un rango (1-10  $\mu\text{M}$ ) que resulta inocuo. Por lo tanto, se establece que la concentración planeada a ser utilizada (2.5  $\mu\text{M}$ ) para frenar el marcado de neuronas activadas no alterará la comunicación sináptica del cerebro de la línea de ratones transgénicos a desarrollar. Al considerar los experimentos previos, se contempla un panorama en el que parece viable utilizar el sistema propuesto para controlar la transcripción de un marcador fluorescente de la actividad neuronal con los antibióticos reguladores Coumermicina-A1 y Novobiocina.

Por otra parte, el segundo objetivo se logró con la construcción del promotor mínimo del gen *Arc/Arg3.1*, el cual consiste en el potenciador distal de aproximadamente 100 pb (SARE) fusionado con el promotor proximal de aproximadamente 400 pb (Kawashima et al., 2009).

En cuanto a la evaluación de este promotor mínimo que se planea implementar para regular la transcripción del transactivador LGA en el sistema de regulación génica, se pretendió validar si dicho promotor recapitula el comportamiento característico del promotor completo del gen *Arc/Arg3.1*. Para dicho propósito se construyó un plásmido (FAGFP-Pmin) que codifica para la proteína EGFP bajo el control del Pmin y se seleccionó a la línea Neuro 2A (N2A) como modelo neuronal para probar la expresión de EGFP ante estimulación con NGF, la cual que está reportada como inductora de la transcripción de *Arc/Arg3.1* en esta línea neuronal (Dickey et al., 2004). Se mostraron tendencias de que el promotor está siendo inducido por la estimulación con NGF bajo tres distintos protocolos, y por lo tanto parece viable que el Pmin construido pueda ser utilizado para controlar la transcripción de la proteína quimérica transactivadora codificada en el plásmido pReg-Neo conforme a la configuración propuesta para elaborar el trasgénico.

## **11. PERSPECTIVAS:**

En un futuro, al corroborar la fidelidad del promotor mínimo construido y verificar si replica el comportamiento del promotor completo en esta y otras líneas celulares, este promotor podrá utilizarse para regular la expresión de la proteína quimérica transactivadora (LGA) del plásmido pReg-Neo. De esta manera, al co-transfectar células con los vectores pReg-Neo modificado con el Pmin y el vector FAGFP (que será regulado por el factor transcripcional LGA ante la adición de Coumermicina), se evaluaría la eficiencia del sistema para inducir la transcripción de la secuencia codificante para EGFP dentro de un tiempo delimitado por la adición de Coumermicina y Novobiocina.

Finalmente, al añadir Novobiocina a distintos tiempos después de la inducción con Coumermicina, se evaluaría mediante q-rt-PCR (PCR cuantitativa en tiempo real) el intervalo de tiempo mínimo que debe esperarse antes de añadir Novobiocina para permitir que se acumule una cantidad suficiente de transcrito de EGFP. Esta cantidad suficiente será determinada extrapolando la cantidad de transcrito a la de proteína transactivadora tTA necesaria para inducir la transcripción de un promotor responsivo a la misma (Tigges et al., 2010). De esta manera se determinará si efectivamente el sistema de regulación génica propuesto es viable para frenar la transcripción de un transgen marcador en un lapso de temporal lo suficientemente corto como para que pueda ser correlacionado con el tiempo destinado al aprendizaje de elementos discretos de una tarea conductual.

## **12. REFERENCIAS Y RECURSOS**

- Ali JA, Jackson AP, Howells AJ, Maxwell A. 1993. The 43-kilodalton N-terminal fragment of the DNA gyrase B protein hydrolyzes ATP and binds coumarin drugs. *Biochemistry*. 32: 2717-2724.
- Bashir Z.I., Tam B. and Collingridge G.L. (1990) Activation of the glycine site in the NMDA receptor is necessary for the induction of LTP. *Neuroscience Letters* 108, 261–266.
- Barksdale KA y Bijur GN. 2009. The basal flux of Akt in the mitochondria is mediated by heat shock protein 90. *J Neurochem*. 108(5): 1289-1299.
- Barnes CA, McNaughton BL, Mizumori SJ, Leonard BW, Lin LH. 1990. Comparison of spatial and temporal characteristics of neuronal activity in sequential stages of hippocampal processing. *Prog Brain Res*. 83: 287-300.
- Barot SK, Chung A, Kim JJ, Bernstein IL. 2009. Functional imaging of stimulus convergence in amygdalar neurons during Pavlovian fear conditioning. *PLoS One*. 4(7): e6156.
- Bliss TV, Cooke SF. 2011. Long-term potentiation and long-term depression: a clinical perspective. *Clinics (Sao Paulo)*. 66:3-17.
- Bliss T, Lømo T. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetised rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol (Lond)*. 232:331–356.
- Bliss TV, Collingridge GL. 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31–39.
- Bock J, Thode C, Hannemann O, Braun K, Darlison MG. 2005. Early socio-emotional experience induces expression of the immediate-early gene *Arc/arg3.1* (activity-regulated cytoskeleton-associated protein/activity-regulated gene) in learning-relevant brain regions of the newborn chick. *Neuroscience*. 133: 625-633.
- Bottenstein JE y Sato GH. 1979. Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented médium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1:514-517.
- Boyden ES, Katoh A, Pyle JL, Chatila TA, Tsien RW, Raymond JL. 2006. Selective engagement of plasticity mechanisms for motor memory storage. *Neuron*. 51: 823-34.
- Bromberg KD, Ma'ayan A, Neves SR, Iyengar R. 2008. Design logic of a cannabinoid receptor signaling network that triggers neurite outgrowth. *Science*. 320: 903–909.
- Burz DS, Beckett D, Benson N, Ackers GK. 1994. Self-assembly of bacteriophage lambda cI

- repressor: effects of single-site mutations on the monomer-dimer equilibrium. *Biochemistry*. 33:8399-8405.
- Buzsáki G. 1989. Two-stage model of memory trace formation: a role for “noisy” brain states. *Neuroscience*. 31: 551–570.
- Cadima-Couto I, Freitas-Vieira A, Nowarski R, Britain-Rosich E, Kotler M, Goncalves J. 2009. *Virology*. 393:286-294.
- Carpenter-Hyland EP, Plummer TK, Vazdarjanova A, Blake DT. 2010. Arc expression and neuroplasticity in primary auditory cortex during initial learning are inversely related to neural activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107: 14828–14832.
- Chawla MK, Guzowski JF, Ramirez-Amaya V, Lipa P, Hoffman KL, Marriott LK, Worley PF, McNaughton BL, Barnes CA. 2005. Sparse, environmentally selective expression of Arc RNA in the upper blade of the rodent fascia dentata by brief spatial experience. *Hippocampus*. 15: 579-586.
- Cole AJ, Abu-Shakra S, Saffen DW, Baraban JM, Worley PF. 1990. Rapid rise in transcription factor mRNAs in rat brain after electroshock-induced seizures. *J Neurochem*. 55: 1920–1927.
- Corrêa SA, Hunter CJ, Palygin O, Wauters SC, Martin KJ, McKenzie C, McKelvey K, Morris RG, Pankratov Y, Arthur JS, Frenguelli BG. 2012. MSK1 regulates homeostatic and experience-dependent synaptic plasticity. *J Neurosci*. 32(38): 13039-13051.
- Cortés-Canteli M, Pignatelli M, Santos A, Perez-Castillo A. 2002. CCAAT/enhancer-binding protein beta plays a regulatory role in differentiation and apoptosis of neuroblastoma cells. *J Biol Chem*. 277(7): 5460-5467.
- Cotic M, Chiu AWL, Jahromi SS, Carlen PL, Bardakjian BL. 2011. Common time–frequency analysis of local field potential and pyramidal cell activity in seizure-like events of the rat hippocampus. *J Neural Eng*. 8: 046024.
- Deisseroth K, Feng G, Majewska AK, Miesenböck G, Ting A, Schnitzer MJ. 2006. Next-generation optical technologies for illuminating genetically targeted brain circuits. *J Neurosci*. 26:10380-10386.
- Desgranges B, Ramirez-Amaya V, Ricano-Cornejo I, Levy F, Ferreira G. 2010. Flavor preference learning increases olfactory and gustatory convergence onto single neurons in the basolateral amygdala but not in the insular cortex in rats. *PLoS One* 5, e10097.
- Dickey CA, De Mesquita DD, Morgan D, Pennypacker KR. 2004. Induction of memory-

- associated immediate early genes by nerve growth factor in rat primary cortical neurons and differentiated mouse Neuro2A cells. *Neurosci Lett.* 366: 10-14.
- Evangelopoulos ME, Weis J, Krüttgen A. 2004. Neurotrophin effects on neuroblastoma cells: correlation with Trk and p75NTR expression and influence of Trk receptor bodies. *J Neurooncol.* 66: 101-110.
- Evangelopoulos ME, Weis J, Krüttgen A. 2005. Signalling pathways leading to neuroblastoma differentiation after serum withdrawal: HDL blocks neuroblastoma differentiation by inhibition of EGFR. *Oncogene.* 24, 3309–3318.
- Frankland PW, Bontempi B, Talton LE, Kaczmarek L, Silva AJ. 2004. The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science.* 304: 881–883.
- Fox NY, Studzinski GP. 1982. DNA dependence and inhibition by novobiocin and coumermycin of the nucleolar adenosine triphosphatase (ATPase) of human fibroblasts. *J Histochem Cytochem.* 30(4): 364-70.
- Gelbard-Sagiv H, Mukamel R, Harel M, Malach R, Fried I. 2008. Internally generated reactivation of single neurons in human hippocampus during free recall. *Science.* 322(5898):96-101.
- Goh JJ, Manahan-Vaughan D. 2013. Synaptic depression in the CA1 region of freely behaving mice is highly dependent on afferent stimulation parameters. *Front Integr Neurosci.* 7:1.
- Goshen I, Brodsky M, Prakash R, Wallace J, Gradinaru V, Ramakrishnan C, Deisseroth K. 2011. Dynamics of Retrieval Strategies for Remote Memories. *Cell.* 147: 678–689.
- Gossen M, Bujard H. 1992. Tight Control of Gene Expression in Mammalian Cells by Tetracycline-Responsive Promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89: 5547–5551.
- Grimes M, Zhou J, Beattie EC, Yuen EC, Hall DE, Valletta JS, Topp KS, LaVail JH, Bunnnett NW, Mobley WC. 1996. Endocytosis of activated TrkA: evidence that nerve growth factor induces formation of signaling endosomes. *J Neurosci.* 16:7950–7964.
- Gusev PA, Alkon DL, Gubin AN. 2010. Arc/Arg3.1 mRNA global expression patterns elicited by memory recall in cerebral cortex differ for remote versus recent spatial memories. *Front Integr Neurosci.* 4:15.
- Gusev PA, Cui C, Alkon DL, Gubin AN. 2005. Topography of Arc/Arg3.1 mRNA expression in the dorsal and ventral hippocampus induced by recent and remote spatial memory

- recall: dissociation of CA3 and CA1 activation. *J Neurosci.* 25: 9384–9397.
- Guzowski JF, Knierim JJ, Moser EI. 2004. Ensemble dynamics of hippocampal regions CA3 and CA1. *Neuron.* 44:581-584.
- Guzowski JF, Lyford GL, Stevenson GD, Houston FP, McGaugh JL, Worley PF, Barnes CA. 2000. Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *J Neurosci.* 20: 3993–4001.
- Guzowski JF, McNaughton BL, Barnes CA, Worley PF. 1999. Environment-specific expression of the immediate-early gene *Arc* in hippocampal neuronal ensembles. *Nat Neurosci.* 2:1120-1124.
- Guzowski JF, Miyashita T, Chawla MK, Sanderson J, Maes LI, Houston FP, Lipa P, McNaughton BL, Worley PF, Barnes CA. 2006. Recent behavioral history modifies coupling between cell activity and *Arc* gene transcription in hippocampal CA1 neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103: 1077–1082.
- Guzowski JF, Setlow B, Wagner EK, McGaugh JL. 2001. Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: a comparison of the immediate-early genes *Arc*, *c-fos*, and *zif268*. *J Neurosci.* 21: 5089–5098.
- Guzowski JF, Timlin JA, Roysam B, McNaughton BL, Worley PF, Barnes CA. 2005. Mapping behaviorally relevant neural circuits with immediate-early gene expression. *Curr Opin Neurobiol.* 15: 599-606.
- Guzowski JF y Worley PF. 2001. Cellular Compartment Analysis of Temporal Activity by Fluorescence In Situ Hybridization (catFISH). *Curr Protoc Neurosci.* Capítulo 1:Unidad 1.8.
- Hall J, Thomas KL, Everitt BJ. 2001. Cellular imaging of *zif268* expression in the hippocampus and amygdala during contextual and cued fear memory retrieval: selective activation of hippocampal CA1 neurons during the recall of contextual memories. *J Neurosci.* 21: 2186–2193.
- Han JH, Kushner SA, Yiu AP, Hsiang HL, Buch T, Waisman A, Bontempi B, Neve RL, Frankland PW, Josselyn SA. 2009. Selective Erasure of a Fear Memory. *Science.* 323: 1492-1496.
- Hashikawa K, Matsuki N, Nomura H. 2011. Preferential *Arc* transcription at rest in the active ensemble during associative learning. *Neurobiol Learn Mem.* 95: 498–504.

- Hebb DO. 1949. *The Organization of Behaviour*. Wiley, New York Cork.
- Hellweg CE, Baumstark-Khan C, Horneck G. 2001. Enhanced green fluorescent protein as reporter protein for biomonitoring of cytotoxic effects in mammalian cells. *Anal Chim Acta*. 427: 191–199.
- Ingraham CA, Wertalik L, Schor NF. 2011. Necdin and Neurotrophin Receptors: Interactors of Relevance for Neuronal Resistance to Oxidant Stress. *Pediatr Res*. 69: 279–284.
- Johnson J.W. and Ascher P. (1987) Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 325, 529–531.
- Kahn I, Davachi L, Wagner AD. 2004. Functional–Neuroanatomic Correlates of Recollection: Implications for Models of Recognition Memory. *J Neurosci*. 24: 4172– 4180.
- Kampranis SC, Bates AD, Maxwell A. 1999. A model for the mechanism of strand passage by DNA gyrase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96: 8414-8419.
- Kawashima T, Okuno H, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Kyo N, Okamura M, Takemoto-Kimura S, Worley PF, Bito H. 2009. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106: 316-321.
- Kelly MP, Deadwyler SA. 2003. Experience-dependent regulation of the immediate-early gene arc differs across brain regions. *J Neurosci*. 23: 6443–6451.
- Kreiman G. 2004. Neural coding: computational and biophysical perspectives. *Phys Life Rev*. 1: 71-102.
- Lad SP y Neet KE. 2003. Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway through p75NTR: A common mechanism for the neurotrophin family. *J Neurosci Res*. 73: 614–626.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 23(21): 2947-2948.
- LePage KT, Dickey RW, Gerwick WH, Jester EL, Murray TF. 2005. On the use of neuro-2a neuroblastoma cells versus intact neurons in primary culture for neurotoxicity studies. *Crit Rev Neurobiol*. 17(1): 27-50.
- Link W, Konietzko U, Kauselmann G, Krug M, Schwanke B, Frey U, Kuhl D. 1995. Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92: 5734-5738.
- Lonergan ME, Gafford GM, Jarome TJ, Helmstetter FJ. 2010. Time-Dependent Expression of Arc and Zif268 after Acquisition of Fear Conditioning. *Neural Plast*. 2010: 13989.

- Lyford GL, Yamagata K, Kaufmann WE, Barnes CA, Sanders LK, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Lanahan AA, 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: 433-445.
- Lynch MA. 2004. Long-Term Potentiation and Memory. *Physiol Rev*. 84: 87–136.
- Lyons MR y West AE. 2011. Mechanisms of specificity in neuronal activity-regulated gene transcription. *Prog Neurobiol*. 94: 259–295.
- Lømo T. 1966. Frequency potentiation of excitatory synaptic activity in the dentate area of the hippocampal formation. *Acta Physiol Scand*. 68(Suppl 277):128.
- McNaughton BL, Barnes CA, Baldwin RG, Rasmussen M. 1986. Longterm enhancement of hippocampal synaptic transmission and the acquisition of spatial information. *J Neurosci*. 6:563–571.
- Malenka RC. 1994. Synaptic Plasticity in the Hippocampus: LTP and LTD. *Cell*. 78:535-538.
- Mamiya N, Fukushima H, Suzuki A, Matsuyama Z, Homma S, Frankland PW, Kida S. 2009. Brain region-specific gene expression activation required for reconsolidation and extinction of contextual fear memory. *J Neurosci*. 29: 402–413.
- Maxwell MA, Muscat GE. 2006. The NR4A subgroup: immediate early response genes with pleiotropic physiological roles. *Nucl Recept Signal*. 4:e002.
- Miyamoto E. 2006. Molecular mechanism of neuronal plasticity: induction and maintenance of long-term potentiation in the hippocampus. *J Pharmacol Sci*. 100:433-442.
- Miyashita T, Kubik S, Lewandowski G, Guzowski JF. 2008. Networks of neurons, networks of genes: An integrated view of memory consolidation. *Neurobiol Learn Mem*. 89: 269–284.
- Neves G, Cooke SF, Bliss TV. 2008. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci*. 9: 65-75.
- Nitz D y McNaughton B. Differential Modulation of CA1 and Dentate Gyrus Interneurons During Exploration of Novel Environments. 2004. *J Neurophysiol*. 91: 863-872.
- Okuno H. 2011. Regulation and function of immediate-early genes in the brain: Beyond neuronal activity markers. *Neurosci Res*. 69: 175–186.
- Pabo CO, Sauer RT, Sturtevant JM, Ptashne M. 1979. The lambda repressor contains two domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76:1608-12.
- Papadakis AI, Baltzis D, BuensucesoRC, Peidis P, Koromilas AE. 2011. Development of

- Transgenic Mice Expressing a Conditionally Active Form of the eIF2a Kinase PKR. *Genesis*. 49: 743–749.
- Park H, Poo MM. 2013. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat Rev Neurosci*. 14:7-23.
- Patterson SL, Pittenger C, Morozov A, Martin KC, Scanlin H, Drake C, Kandel ER. 2001. Some Forms of cAMP-Mediated Long-Lasting Potentiation Are Associated with Release of BDNF and Nuclear Translocation of Phospho-MAP Kinase. *Neuron*. 32 :123–140.
- Pignatelli M, Cortés-Canteli M, Santos A, Perez-Castillo A. 1999. Involvement of the NGFI-A gene in the differentiation of neuroblastoma cells. *FEBS Lett*. 461(1-2): 37-42.
- Ploski JE, Pierre VJ, Smucny J, Park K, Monsey MS, Overeem KA, Schafe GE. 2008. The activity-regulated cytoskeletal-associated protein (Arc/Arg3.1) is required for memory consolidation of pavlovian fear conditioning in the lateral amygdala. *J Neurosci*. 28: 12383–12395.
- Polyn SM, Natu VS, Cohen JD, Norman KA. 2005. Category-specific cortical activity precedes recall during memory search. *Science*. 310(5756): 1963-1966.
- Promega Technical Manual: Regulated Mammalian Expression System. Promega Instructions for use of product C9470.
- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, et al., editors. 2001. *Neuroscience*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- R Development Core Team. 2010. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL: <http://www.R-project.org/>
- Ramírez-Amaya V, Vazdarjanova A, Mikhael D, Rosi S, Worley PF, Barnes CA. 2005. Spatial exploration-induced Arc mRNA and protein expression: evidence for selective, network-specific reactivation. *J Neurosci*. 25:1761-8.
- Rangel-Guerrero. 2010. Tesina de Licenciatura para obtener el grado de ‘Licenciado en Ciencias Genómicas’ por parte de la UNAM Campus Cuernavaca. Título: Sistema inducible para el marcado de neuronas activadas por elementos discretos de una tarea conductual: diseño y evaluación.
- Rapanelli M, Lew SE, Frick LR, Zanutto BS. 2010. Plasticity in the rat prefrontal cortex: linking gene expression and an operant learning with a computational theory. *PLoS*

- One. 5:e8656.
- Rasband WS. ImageJ. 1997-2011. U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. URL: <http://imagej.nih.gov/ij/>
- Redmond L, Kashani AH, Ghosh A. 2002. Calcium regulation of dendritic growth via CaM kinase IV and CREB-mediated transcription. *Neuron*. 34:999–1010.
- Sacco T y Sacchetti B. 2010. Role of secondary sensory cortices in emotional memory storage and retrieval in rats. *Science*. 329: 649–656.
- Saddoris MP, Holland PC, Gallagher M. 2009. Associatively learned representations of taste outcomes activate taste-encoding neural ensembles in gustatory cortex. *J Neurosci*. 29:15386–15396.
- Santos MG, Jorge SA, Brillet K, Pereira CA. 2007. Improving heterologous protein expression in transfected *Drosophila* S2 cells as assessed by EGFP expression. *Cytotechnology*. 54:15-24.
- Satvat E, Schmidt B, Argraves M, Marrone DF, Markus EJ. 2011. Task Demands and Granule Cell Remapping. *J Neurosci*. 31:7163–7167.
- Schmid RM, Liptay S, Betts JC, Nabel GJ. 1994. Structural and Functional Analysis of NF-KB. *J Biol Chem*. 269: 32162-32167.
- Schultz SR y Rolls ET. 1999. Analysis of Information Transmission in the Schaffer Collaterals. *Hippocampus*. 9:582–598.
- Scoville WB y Milner B. 1957. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 20:11–21.
- Seung HS. 2000. Half a century of Hebb. *Nat Neurosci*. 3 Suppl:1166.
- Shirvankar PR. 2009. Hippocampal neural assemblies and conscious remembering. *J Neurophysiol*. 101: 2197–2200.
- Soulé J, Alme M, Myrum C, Schubert M, Kanhema T, Bramham CR. 2012. Balancing Arc synthesis, mRNA decay, and proteasomal degradation: maximal protein expression triggered by rapid eye movement sleep-like bursts of muscarinic cholinergic receptor stimulation. *J Biol Chem*. 287:22354-22366.
- Squire LR. 1992. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol Rev*. 99: 195–231.
- Steward O y Worley PF. 2001. A cellular mechanism for targeting newly synthesized mRNAs to synaptic sites on dendrites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98(13): 7062-7068.

- Tigges M, Déneraud N, Greber D, Stelling J, Fussenegger M. 2010. A synthetic low-frequency mammalian oscillator. *Nucleic Acids Res.* 38: 2702-2711.
- Vazdarjanova A, McNaughton BL, Barnes CA, Worley PF, Guzowski JF. 2002. Experience-dependent coincident expression of the effector immediate-early genes *arc* and *Homer 1a* in hippocampal and neocortical neuronal networks. *J Neurosci.* 22(23): 10067-10071.
- Vazdarjanova A y Guzowski JF. 2004. Differences in hippocampal neuronal population responses to modifications of an environmental context: Evidence for distinct, yet complementary, functions of CA3 and CA1 ensembles. *J Neurosci.* 24: 6489–6496.
- Varshavsky A. 1996. The N-end rule. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 60: 461–478.
- Velho TA, Pinaud R, Rodrigues PV, Mello CV. 2005. Co-induction of activity-dependent genes in songbirds. *Eur J Neurosci.* 22: 1667-16678.
- Vidugiriene J, Hartnett J, Schenborn E, Slater MR, Promega Corporation. 2007. A Novel System for Regulated Protein Expression in Mammalian Cells. *Promega notes* 2007. 95: 8-11.
- Wallace CS, Lyford GL, Worley PF, Steward O. 1998. Differential intracellular sorting of immediate early gene mRNAs depends on signals in the mRNA sequence. *J Neurosci.* 18:26–35.
- Waltereit R, Dammermann B, Wulff P, Scafidi J, Staubli U, Kauselmann G, Bundman M, Kuhl D. 2001. *Arg3.1/Arc* mRNA induction by  $Ca^{2+}$  and cAMP requires protein kinase A and mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase activation. *J Neurosci.* 21(15): 5484-93.
- Wang JQ, Fibuch EE, Mao L. 2007. Regulation of mitogen-activated protein kinases by glutamate receptors. *J Neurochem.* 100:1-11.
- Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, Bear MF. 2006. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science* 313, 1093–1097.
- Wisden W, Errington ML, Williams S, Dunnett SB, Waters C, Hitchcock D, Evan G, Bliss TV, Hunt SP. 1990. Differential expression of immediate early genes in the hippocampus and spinal cord. *Neuron.* 4(4): 603-614.
- Worley PF, Bhat RV, Baraban JM, Erickson CA, McNaughton BL, Barnes CA. 1993. Thresholds for synaptic activation of transcription factors in hippocampus: correlation with long-term enhancement. *J Neurosci.* 13(11): 4776-4786.
- Yin Y, Edelman GM, Vanderklish PW. 2002. The brain-derived neurotrophic factor enhances

- synthesis of Arc in synaptoneurosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(4): 2368-2373.
- Zhang Y, Moheban DB, Conway BR, Bhattacharyya A, Segal RA. 2000. Cell surface Trk receptors mediate NGF-induced survival while internalized receptors regulate NGF-induced differentiation. *J Neurosci.* 20: 5671–5678.
- Zhao HF, Boyd J, Jolicoeur N, Shen SH. 2003. A coumermycin/novobiocin-regulated gene expression system. *Hum Gene Ther.* 14: 1619-1629.

### **13. LISTA DE ABREVIATURAS**

AC: adenilato ciclasa.

ADN: ácido deoxi-ribonucleico.

Akt: proteín cinasa beta.

AMPA:  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-methyl-4-isoxazol ácido epropiónico.

ARN: ácido ribonucleico.

Arc/Arg3.1: proteína asociada a citoesqueleto regulada por actividad/ gen regulado por actividad 3.1.

ATP: adenosina trifosfato.

BDNF: factor neurotrófico derivado de cerebro.

BIC: Bicuculina.

CA1: *Cornu Ammonis I.*

CA3: *Cornu Ammonis III.*

cAMP: adenosina monofosfato cíclica.

CaMKII: cinasa II dependiente de calcio/calmodulina.

CaMKIV: cinasa IV dependiente de calcio/calmodulina.

CaN, calcineurina/PP2B.

catFISH: Análisis celular Compartamental de la actividad Temporal por Hibridación *In Situ* Fluorescente.

CBP: proteína de unión a CREB.

CREB: proteína de unión a elemento responsivo a adenocina monofosfato cíclica.

CRTC: co-activador de transcripción regulado por CREB.

DAG: diacilglicerol.

dB: decibeles.

db-cAMP: dibutiril – Adenosina Monofosfato cíclica.

Der: derecha.

DMEM: medio mínimo esencial de Eagle modificado por Dulbecco y Vogt.

Dox: doxiciclina.

e.g: *exempli gratia.*

EGFP: Proteína Verde Fluorescente Mejorada.

EGFR: Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal.

ERK1/2: cinasas 1 y 2 reguladas por señales extracelulares, parte de la familia de las proteín-cinasas activadas por mitógenos.

GBA#: número de acceso a GenBank.

hrs : horas.

Hz: hertz.

IEG: gen de expresión inmediata temprana.

IP3: inositol trifosfato.

Izq: Izquierda.

LB: caldo para lisogenia.

LGA: Proteína quimérica transactivadora.

mA: miliamperios.

mAChR: receptores metabotrópicos de tipo para acetilcolina.

MAPK: proteín cinasa activada por mitógenos.

MEF2: Factor-2 potenciador de Miocitos.

MEK: proteín-cinasa-cinasa activada por mitógenos. También llamada MAPKK.

µg: microgramo.

mGluR: receptores metabotrópicos a glutamato del grupo 1.

min: minutos.

µl: microlitro.

ml: mililitro.

µm: micrómetro.

µM: micromolar.

MSK1: proteín-cinasa de serina/treonina del grupo AGC. También conocida como proteína ribosomal de 90 kDa S6 cinasa alpha-5, KS6A5, MGC1911, MSPK1, proteín-cinasa 1 activada por mitógeno nuclear y estrés, polipéptido 5, RLPK, RPS6KA5, porteín cinasa de tipo RSK, RSKL y S6K-alpha-5.

N2A: Neuroblastoma 2A.

ng: nanogramos.

NGF: Factor de Crecimiento Neural.

NIH3T3: línea celular derivada de fibroblastos.

nM: nanomolar.

NMDA: N-metil-D-aspartato.  
NT-3: receptor a neurotropinas 3.  
NT-4: receptor a neurotropinas 4.  
NO: óxido nítrico.  
p75: receptor de baja afinidad a neurotropinas.  
pb : pares de bases.  
PBS: salina amortiguada con fosfato.  
PC12: línea celular derivada de pheocromocitomas.  
PCR: reacción en cadena de la polimerasa.  
PCNA: línea celular derivada de fibroblastos.  
PIP2: fosfatidil inositol trifosfato.  
PKA: proteín-cinasa A.  
PKC: proteín-cinasa C.  
PLC, fosfolipasa C.  
PI3: fosfatidil-inositol-3-cinasa.  
pp: página(s).  
q-rt-PCR: PCR cuantitativa en tiempo real.  
Raf: familia de proteín-cinasas de serina/treonina.  
SARE: Elemento Responsivo a la Actividad Sináptica.  
SBF: Suero Bovino Fetal.  
seg: segundos.  
SH-SY5Y: línea celular derivada de neuroblastoma de origen humano.  
SNC: Sistema nervioso central.  
SRF : Factor de respuesta al suero.  
tau-LacZ: LacZ tautómero  
Tet: Tetraciclina.  
TetO: operador responsivo a Tetraciclina.  
TrkA: receptor tirocín-cinasa tipo 1 a neurotropinas.  
TrkB: cinasa B relacionada a tropomiocina.  
tTA: transactivador de tetraciclina.  
YFP: proteína amarilla fluorescente.  
Zif268: Proteína de dedos de zink 225.

## 14. LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.- A)** Figura modificada de Schultz y Rolls, 1999. Anatomía básica de la formación hipocampal ejemplificando una sinapsis. La información entra al hipocampo desde la corteza entorrinal (EC) mediante la vía perforante (PP), la cual proyecta al giro dentado (DG) que contiene células granulares y a las áreas CA3 y CA1 del hipocampo que contienen células piramidales. CA3 tiene proyecciones recurrentes dentro de CA3 y también hacia CA1 mediante las colaterales de Schaffer (SC). CA3 también recibe sinapsis del DG mediante las fibras musgosas (MF). La información sale del hipocampo mediante proyecciones a la EC y el subículo desde CA1, así como mediante el fórnix hacia los cuerpos mamilares y el núcleo anterior del tálamo (no ilustrado). CA1, CA3 y DG también reciben entradas colinérgicas del septum medial por la vía septo-hipocampal (SHP). **B)** Figura modificada de Patterson et al., 2001 y Romberg et al., 2009. Esquema de inducción de LTP mediante estimulación de alta frecuencia. Se aplican 4 trenes de 100 pulsos a 100Hz espaciados 5 min en las colaterales de Schaffer, y se registran las dendritas de las neuronas piramidales de CA1, para identificar la potenciación de largo plazo que se muestra como un aumento en la amplitud del trazo de la respuesta.

pp. 5

**Figura 2.-** Figura modificada de Bliss y Cooke, 2011. Modelo de los eventos moleculares que contribuyen a los cambios plásticos en las sinapsis. Tomando como ejemplo la potenciación a largo plazo (LTP), se inicia con la liberación de glutamato de la presinapsis, lo cual, aunado a la depolarización activa a los receptores NMDA y conlleva al flujo de  $Ca^{2+}$  en la neurona postsináptica. El aumento en el  $Ca^{2+}$  intracelular activa a la  $Ca^{2+}$ /calmodulina, que a su vez activa numerosas cinasas y fosfatasas. La CaMKII fosforila a los receptores AMPA en la membrana y promueve la inserción de más receptores. La fase tardía de la LTP se obtiene al reclutar la AC que activa a la PKA y a ERK1/2. Estas cinasas se translocan al núcleo y activan factores de transcripción como CREB y MEF, que activan a genes blanco como Arc y BDNF y en conjunto permiten los cambios estructurales en las sinapsis. Se ilustra también la LTD dependiente de los mGluR, los cuales activan una cascada de señalización que rompe el lípido de membrana PIP2 - mediante la PLC- en IP3 y DAG, que liberan el calcio intracelular y activan la PKC respectivamente. La PKC disminuye la conductancia de

los receptores AMPA y ocurre LTD junto con la liberación de NO a la presinapsis. AC, adenilato ciclasa; AMPAR, receptores de ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico ; Arc, proteína del citoesqueleto regulada por actividad; ATP, adenosina trifosfato; BDNF, factor neurotrópico derivado de cerebro; cAMP, adenosina monofosfato cíclica; CaMKII, cinasa dependiente de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina II; CaN, calcineurina/PP2B; CBP, proteína de unión a CREB; CREB, proteína de unión al elemento responsivo a AMP cíclico; CRTC, co-activador de transcripción regulado por CREB; DAG, diacilglicerol; ERK1/2, cinasa regulada extracelularmente; IP3, inositol trifosfato; MEF2, factor 2 potenciador de miocitos; mGluR, receptores metabotrópicos a glutamato del grupo 1; NMDAR, receptores de N-metil-D-aspartato; NO, óxido nítrico; p75, receptor a neurotropinas; PIP2, fosfatidil inositol trifosfato; PKA, cinasa dependiente de AMP cíclico; PKC, proteína cinasa C; PLC, fosfolipasa C; SRF, elemento responsivo al suero; TRKB, cinasa B relacionada a tropomiocina.

pp. 7

**Figura 3.-** Figuras modificadas de Kawashima et. al., 2009 y Okuno, 2011. **A)** Se ilustra la localización en el genoma de ratón (-7000 pb) de la caja conservada (SARE) identificada como el potenciador primordial que confiere el patrón de expresión al gen Arc/Arg3.1; la del promotor proximal (ArcMin) abarcando 421 pb río arriba del inicio de transcripción; y la configuración de un vector en el que se fusionaron ambas secuencias reguladoras para controlar la transcripción de un gen reportero. **B)** Después de estimular con 4-aminopiridina/Bicuculina(BIC) se mide la actividad de la luciferasa en neuronas transfectadas con un vector codificando para luciferasa bajo el promotor ArcMin, ó SARE-ArcMin ó bien el promotor completo ('Arc7000'). Demuestra que el promotor mínimo SARE-ArcMin recapitula la expresión conferida por el promotor completo ('Arc7000'), y ambas son significativamente mayores a la actividad conferida por el promotor proximal ('ArcMin') con un p-val de 0.001. **C)** Mecanismo putativo de la inducción de la expresión de Arc/Arg3.1 por actividad sináptica. Ante actividad sináptica, los receptores NMDA (NMDA-R), los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) y los receptores IP3 (IP3-R) contribuyen al incremento en el Ca<sup>2+</sup> intracelular. Éste inicia varias cascadas de señalización de cinasas y fosfatasas, como la ERK, CaN, CaMKIV y CaMKK. La señalización sináptica

converge en el elemento potenciador distal SARE, al reclutar un complejo que consiste en los factores de transcripción dependientes de actividad CREB, MEF2 y SRF, así como sus coactivadores TCF, MKL, CBP, p300 y CRTC. Este complejo transcripcional recluta al complejo de pre-iniciación próximo al sitio de inicio de transcripción (flecha roja) e inicia la transcripción de Arc. Arc, proteína del citoesqueleto regulada por actividad; CaN, calcineurina/PP2B; CaMKIV y CaMKK, cinasas dependiente de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina IV y II; CBP, proteína de unión a CREB; CREB, proteína de unión al elemento responsivo a AMP cíclico; CRTC, co-activador de transcripción regulado por CREB; ERK, cinasa regulada extracelularmente; MEF2, factor 2 potenciador de miocitos; MEK, proteína activada por mitógenos; MKL, leucemia megakarioblástica; SARE, elemento responsivo a actividad sináptica; SRF, elemento responsivo al suero; TCF, factor del complejo ternario.

pp. 19

**Figura 4.-** Figura modificada de Reijmers et al. (2007). **A)** Se muestra el sistema responsivo a tetraciclina implementado en el ratón Tet-Tag. La ventana temporal para marcar neuronas se inicia al someter al animal a una dieta sin Doxyciclina (Dox), representada por el bloque blanco intermedio. La activación neuronal activa el ciclo retroalimentado de activación transcripcional y comienza la expresión tanto del marcador tau-LacZ como de una versión del transactivador de tetraciclina (tTA\*) insensible a la droga. La ventana de marcado se termina al regresar al ratón a una dieta conteniendo Dox, ya que se bloquea nueva activación del promotor bidireccional TetO. Sin embargo, las neuronas activadas previamente continúan expresando el marcador gracias al bucle retroalimentado por tTA\*. **B)** Protocolo diseñado para detectar la reactivación de las neuronas involucradas en el aprendizaje y la evocación del miedo condicionado. El condicionamiento origina la expresión de genes de expresión inmediata temprana, incluyendo a C-fos y Zif268; y dado que se lleva a cabo durante la ausencia de Dox, se induce también la expresión a largo plazo de Lac-z. La evocación se efectúa 3 días después del aprendizaje y en presencia de Dox, lo que previene subsecuente activación del bucle retroalimentado que generaría la expresión constitutiva de LacZ. Una hora después de la evocación, se disectó el cerebro para utilizar a las proteínas codificadas por LacZ (LAC) y Zif268 (ZIF) como indicadores de actividad neuronal en dos tiempos distintos.

pp. 22

**Figura 5.-** Figura modificada del Manual del producto C9470 de Promega. Esquema del vector ‘pReg neo’ que codifica para la proteína quimérica transactivadora (en azul) compuesta por sus tres dominios: 1) el dominio de unión al ADN del represor Lambda (‘ $\lambda$ Rep’), 2) el dominio de la girasa bacteriana para la interacción con los antibióticos reguladores (‘GyrB’), y 3) el dominio de activación transcripcional del NF $\kappa$ B-p65 (‘AD’). El promotor de esta proteína quimérica se compone del promotor temprano del virus SV40, 6 copias en tándem del sitio responsivo al represor  $\lambda$  (en morado), y un promotor mínimo de citomegalovirus (CMV).

pp.26

**Figura 6.-** Figura modificada del Manual del producto C9470 de Promega. Esquema del vector ‘pF12A RM Flexi’ que está diseñado para introducir el gen de interés reemplazando el gen que codifica para la proteína letal Barnasa (en rojo). La regulación del transgen sería dada por el promotor mínimo de citomegalovirus (CMV) y 12 secuencias en tándem de operadores  $\lambda$  (en morado) que atraerían a la proteína quimérica transactivadora dimerizada por Coumermicina.

pp.27

**Figura 7.-** Figura modificada del Manual del producto C9470 de Promega. Esquema del ‘Regulated Mammalian Expression System’ compuesto por dos vectores que codifican para el gen regulado y la proteína quimérica transactivadora ( $\lambda$ Rep-GyrB-AD), la cual tiene una afinidad 2:1 con las moléculas de Coumermicina-A1 (rombos) y 1:1 con las moléculas de Novobiocina (óvalos). Se aprecia el estado “encendido” de la transcripción del gen regulado y de la propia  $\lambda$ Rep-GyrB-AD ante la presencia de Coumermicina-A1; y el estado de “apagado” ante la presencia de Novobiocina que evita la transcripción del gen regulado y disminuye a los niveles basales la transcripción de  $\lambda$ Rep-GyrB-AD.

pp.28

**Figura 8.-** Esquema del sistema final propuesto. **A)** En una neurona inactiva se esperarían

únicamente bajos niveles de transcripción basal y poca traducción de la proteína quimérica transactivadora LGA ( $\lambda$ GA: círculos azules) y del transactivador de Tetraciclina (tTA: cuadros naranjas). **B)** Al administrar Coumermicina y ante actividad neuronal, el promotor mínimo de *arc/arg3.1* ('SARE-ArcMin') induce la transcripción de  $\lambda$ GA, la cual se dimeriza y actúa como factor de transcripción al unirse a su operador responsivo (TATA- $\lambda$ Op: en azul marino) y así promover la transcripción de la proteína tTA que a su vez se unirá al promotor bidireccional Tet-Op (en azul turquesa) y activará un bucle retroalimentado que expresará el gen codificante de la proteína verde fluorescente (EGFP: estrellas verdes). **C)** Después de administrar el antibiótico Novobiocina, se disocian los dímeros de la proteína quimérica transactivadora y por lo tanto se evita la transcripción de tTA a pesar de que ocurra actividad neuronal. **D)** Una vez que el promotor bidireccional Tet-Op es activado en alguna célula, ésta continuará expresando EGFP sin importar la actividad neuronal o presencia de antibióticos.

pp.30

**Figura 9.-** Modelo de los procesos moleculares que consideraron para simular la cinética de las interacciones involucradas en el sistema de regulación génica propuesto. Coumermicina (COUM); proteína LGA (LGA); Novobiocina (NOV); dímero de LGA (LGA dim); transactivador de tetraciclina (tTA); RNA mensajero del tTA (m\_tTA); elemento responsivo al tTA (TRE); proteína verde fluorescente (GFP); RNA mensajero de GFP (m\_GFP); operadores lambda ( $12\lambda$ -OP).

pp. 32

**Figura 10.-** Registros electrofisiológicos de la actividad poblacional de CA1 en distintas condiciones. **A)** Trazo de los 20 min de tiempo control. **B)** Trazo de los 20 min con Coumermicina-A1 5 $\mu$ M en el aCSF circulante (no se observan cambios en la actividad). **C)** Trazo de los primeros 20 min con Novobiocina 2.5 mM (se observa un notable cambio en la actividad). **D)** Trazo de los últimos 20 min con 2.5 mM (se observa actividad paroxística). En el eje de las ordenadas se indica el voltaje (mV). En el eje de las abscisas se observa el tiempo (segundos) de registro.

pp.34

**Figura 11.-** Trazo representativo de los registros de la actividad espontánea en la región CA1 de rebanadas horizontales de cerebro de ratón durante 200 min. En el eje de las ordenadas se indica el voltaje (V). En el eje de las abscisas se observa el tiempo (min) de registro, donde los primeros minutos corresponden a la actividad basal, la leyenda “Tag1” indica la adición de Novobiocina 1  $\mu$ M, la leyenda “Tag2” indica la adición de Novobiocina 3  $\mu$ M, la leyenda “Tag3” indica la adición de Novobiocina 10  $\mu$ M y la leyenda “Tag4” sobre la línea roja indica la adición de Lidocaína 1 mM.

pp. 53

**Figura 12.-** Espectro de Potencia (Densidad espectral) de la actividad muestreada a partir de un trazo representativo de los registros de la actividad espontánea en la región CA1 de rebanadas de cerebro de ratón durante 200 min. En el eje de las abscisas se indica la Frecuencia (Hz), y el eje de las ordenadas muestra la Potencia de la densidad espectral ( $V^2/Hz$ ) correspondiente. Las líneas de colores representan la actividad correspondiente a cada condición: roja a Basal, verde seco a Lidocaína 1 mM, turquesa a T1 (Novobiocina 1  $\mu$ M), azul a T2 (Novobiocina 3  $\mu$ M), y fuchsia a T3 (Novobiocina 10  $\mu$ M).

pp.55

**Figura 13.- A)** Promedio y error estándar (EE) de la potencia registrada en 6 rebanadas en 5 rangos de frecuencia ante distintas condiciones: los 20 min iniciales (basal), Novobiocina 1  $\mu$ M (T1), Novobiocina 3  $\mu$ M (T2), Novobiocina 10  $\mu$ M (T3), y Lidocaína 1 mM (lido). **B)** Mediana y desviación absoluta de la mediana (MAD) de la potencia registrada en 6 rebanadas en 5 rangos de frecuencia ante distintas condiciones: los 20 min iniciales (basal), Novobiocina 1  $\mu$ M (T1), Novobiocina 3  $\mu$ M (T2), Novobiocina 10  $\mu$ M (T3), y Lidocaína 1 mM (lido).

pp. 56

**Figura 14.-** Patrón de restricción para verificar la identidad de los plásmidos. **A)** Digestión del vector pEGFP-N1 con las enzimas EcoRI y NotI, se observan los fragmentos esperados de 4558 y 772 pb. **B)** Vector pGL4.11-Arc7000-Venus-pest digerido con la enzima BglII, se observan los fragmentos esperados de 615, 1090, 2562, 3032 y 4319 pb. **C)** Vector

pReg-Neo digerido con las enzimas EcoRI y SalI, se observan los fragmentos esperados de 583, 1279 y 4940 pb.

pp.57

**Figura 15.-** Diagrama del sistema propuesto acotado a los objetivos de este trabajo. Se propuso modificar el plásmido ‘pF12A RM Flexi’ del sistema base comercializado por Promega y añadir la secuencia que codifica para la proteína verde fluorescente (EGFP) bajo el control del promotor mínimo del gen *Arc/Arg3.1* (SARE-ArcMin) armado previamente. El plásmido construido se denomina FAGFP-Pmin. Se espera que ante actividad neuronal, las células transfectadas expresen EGFP y puedan ser cuantificadas.

pp.58

**Figura 16.-** Construcción del plásmido EGFPpjet. **A) 1:** Marcador de peso molecular. **3-10:** Productos obtenidos en los ensayos de PCR empleado gradientes de temperatura para amplificar la secuencia de EGFP (745 pb). **B) 1:** Marcador de peso molecular. **2-4:** Triplicado de una PCR utilizando los oligonucleótidos diseñados para amplificar EGFP, el producto fue purificado y clonado en el pJet1.2 (“EGFPpJet”).

pp.58

**Figura 17.-** Construcción del plásmido FA-GFP. **A) 1:** Marcador de peso molecular. **2:** Plásmido pF12A RM Flexi digerido con las enzimas SgfI y PmeI, se purificó la banda del plásmido (3130pb). **3:** Plásmido EGFPpJet sin digerir. **4:** EGFPpJet digerido con las enzimas SgfI y PmeI, se purificó la banda de 730pb correspondiente a EGFP y se ligó al vector pF12ARM. **B) 1:** Marcador de peso molecular. **2-11:** Productos de la PCR de colonias candidato portadoras del plásmido FA-GFP.

pp.59

**Figura 18.-** Análisis de productos de PCR. **A) 1:** Marcador de peso molecular. **2:** Producto de PCR correspondiente al fragmento SARE (108pb). **B) 1:** Marcador de peso molecular. **2:** corresponde al producto de PCR del fragmento del promotor mínimo de Arc

("Pmin") de 550pb. **3:** fragmento ArcMin (402pb). **C) 1-8:** Producto de PCR de colonias candidato portadoras del plásmido Pmin-pJet. **9:** Marcador de peso molecular.

pp.60

**Figura 19.-** Construcción del plásmido FAGFP-Pmin. **A)** **1:** Marcador de peso molecular. **2:** Plásmido Pmin-pjet digerido con las enzimas HindIII y XhoI; se purificó el fragmento de 841 pb. **3:** vector FAGFP digerido con las enzimas HindIII y XhoI; se purificó el fragmento de 3.4 kb. **B)** Patrón de digestión del vector FAGFP-Pmin digerido con **1:** NdeI y SacI, **2:** con SgfI y PmeI. **3:** Marcador de peso molecular.

pp. 61

**Figura 20.-** Células N2A transfectadas con el plásmido control pEGFP-N1 a las cuales no se les indujo diferenciación. Fotografías tomadas con objetivo 20X a las 22 hrs post-transfección. **Izq:** cuerpos celulares iluminados con luz transmitida sin retirar el filtro de fluorescencia. **Der:** fluorescencia de las mismas células. La barra blanca indica 50 micras.

pp.62

**Figura 21.-** Protocolo #1: Células N2A diferenciadas durante 46 hrs. **A)** Transfectadas con el plásmido EGFP-N1. **B)** Transfectadas con el plásmido FAGFP-Pmin e inducidas con NGF durante 1hr. **C)** Transfectadas con el plásmido FAGFP-Pmin, sin tratamiento. Fotografías tomadas con objetivo 20X a las 6 hrs después de haber añadido NGF. **Izq:** núcleos celulares teñidos con DAPI. **Centro:** fluorescencia de las mismas células. **Der:** en rojo la fluorescencia sobre el umbral determinado. La barra indica 50 micras.

pp.64

**Figura 22.-** Protocolo #2: Células N2A diferenciadas durante 87 y tratadas durante 1 hr. **A)** Transfectadas con el plásmido EGFP-N1. **B)** Transfectadas con el plásmido FAGFP-Pmin e inducidas con NGF **C)** Transfectadas con el plásmido FAGFP-Pmin, sin tratamiento. Fotografías tomadas con objetivo 20X a las 22 hrs después de haber añadido NGF. **Izq:** núcleos celulares teñidos con DAPI. **Centro:** fluorescencia de las mismas células. **Der:** en rojo la fluorescencia sobre el umbral determinado. La barra indica 50 micras.

pp.65

**Figura 23.-** Protocolo #3: Células N2A diferenciadas durante 36 hrs. **A)** Transfectadas con el plásmido EGFP-N1. **B)** Transfectadas con el plásmido FAGFP-Pmin e inducidas con NGF durante 22 hr. **C)** Transfectadas con el plásmido FAGFP-Pmin, y sin inducir con NGF. Fotografías tomadas con objetivo 20X a las 22 hrs después de haber comenzado la estimulación con NGF. **Izq:** cuerpos celulares iluminados con luz transmitida sin retirar el filtro de fluorescencia. **Centro:** fluorescencia de las mismas células. **Der:** en rojo la fluorescencia sobre el umbral determinado. La barra indica 50 micras.

pp. 66

**Figura. 24.-** Porcentaje promedio y error estándar (EE) de células transfectadas con el vector FAGFP-Pmin expresando EGFP (EGFP(+)) ante los distintos tratamientos: diferenciadas previamente e inducidas con 100ng/ml del factor de crecimiento neural ('NGF'), ó sin tratar ('NoInd'). Los protocolos de inducción consistieron ya sea en aplicar el tratamiento con NGF durante 1 hr y evaluando a las células fluorescentes a las 6 (Protocolo #1) y a las 22 hrs después de la inducción (Protocolo #2), ó bien en aplicar el tratamiento durante 20-22 hrs (Protocolo #3). En cada protocolo se advierte que el porcentaje de células EGFP(+) en las células tratadas con NGF es siempre mayor al de las no tratadas.

pp.67

**Figura. 25.-** Media y error estándar (EE) de la inducción ante cada tratamiento mencionado, mostrado como porcentaje de la proporción de células EGFP(+) de las células no tratadas, consideradas como la expresión basal (100%) dada por el promotor Pmin. En el eje de las abscisas se indican los tratamientos: inducción con NGF 100ng/ml (NGF). Se indica el protocolo experimental al que corresponde cada barra en la gráfica: tratamiento durante 1 hr evaluando a las células fluorescentes a las 6 hrs (Protocolo #1), tratamiento durante 1 hr evaluando a las células fluorescentes 22 hrs después de la inducción (Protocolo #2), tratamiento continuo durante 22 hrs (Protocolo #3). Los asteriscos indican diferencias significativas entre las células tratadas con NGF y las no tratadas ( $P < 0.05$ ).

pp. 68

**Figura 26.-** Figura modificada de Dickey et al., 2004. Media y error estándar (EE) de la inducción de la expresión de IEGs ante la exposición a NGF durante 1 hr. La expresión diferencial de los genes sobrerregulados se presenta como porcentaje de la expresión en las células no tratadas con NGF. **A)** En cultivos primarios de neuronas de rata se sobreexpresan los genes de expresión inmediata temprana (IEGs) *Zif268*, *Arc/Arg3.1* y *Nur77*, pero no los genes relacionados con plasticidad *gap43* y la subunidad  $\alpha$ III de la ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . **B)** En cultivos de células N2A diferenciadas también se sobreexpresan los genes de expresión inmediata temprana (IEGs) *Zif268*, *Arc/Arg3.1* y *Nur77*, pero no los genes relacionados con plasticidad *Gap43* y la subunidad  $\alpha$ III de la ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . Los asteriscos indican diferencias significativas entre las células tratadas con NGF y las no tratadas ( $P < 0.05$ ).

pp. 72

## **15. LISTA DE TABLAS**

**Tabla 1.-** Secuencias y características de los oligonucleótidos diseñados.

pp. 44

**Tabla 2.** Protocolo para siembra y transfección de células basado en las instrucciones de uso del producto Lipofectamina LTX de Invitrogen.

pp. 50

## 16. MATERIAL ANEXO

### 16.1 Código para el análisis de los datos electrofisiológicos:

```
#R version 2.15.1 (2012-06-22) -- "Roasted Marshmallows" Copyright (C) 2012 The R Foundation
for Statistical Computing ISBN 3-900051-07-0 Platform: x86_64-apple-darwin9.8.0/x86_64 (64-
bit)

setRepositories(ind=1:2);install.packages("ggplot2");install.packages("sp");install.packages("
spdep");install.packages("rgdal");install.packages("mapproj");install.packages("deldir");inst
all.packages("coda");install.packages("LearnBayes");install.packages("spdep");install.packages
("splancs")
setwd("/Users/ketino/Dropbox/res_clampfit/")
library(lattice); library(plotrix); library(multcomp); library(reshape2); library(ggplot2)

##### DEFINO LAS FUNCIONES
##### de "Cookbook for R - Powered by Markdoc", da conteo, media, desviación y error estándar
e intervalo de confianza:
summarySE <- function(data=NULL, measurevar, groupvars=NULL, na.rm=TRUE,
                      conf.interval=.95, .drop=TRUE) {
  require(plyr)
  length2 <- function(x, na.rm=FALSE) {
    if (na.rm) sum(!is.na(x))
    else length(x)
  }
  datac <- ddply(data, groupvars, .drop=.drop,
                .fun= function(xx, col, na.rm) {
                  c( N = length2(xx[,col], na.rm=na.rm),
                    mean = mean (xx[,col], na.rm=na.rm),
                    sd = sd (xx[,col], na.rm=na.rm)
                  )
                },
                measurevar,
                na.rm
  )
  datac <- rename(datac, c("mean"=measurevar))
  datac$se <- datac$sd / sqrt(datac$N)
  ciMult <- qt(conf.interval/2 + .5, datac$N-1) # e.g., if conf.interval is .95, use .975
(above/below), and use df=N-1
  datac$ci <- datac$se * ciMult
  return(datac)
}
##### mi versión modificada para usar mediana
mediana <- function(data=NULL, measurevar, groupvars=NULL, na.rm=TRUE,
                   conf.interval=.95, .drop=TRUE) {
  require(plyr)
  length2 <- function(x, na.rm=TRUE) {
    if (na.rm) sum(!is.na(x))
    else length(x)
  }
  datac <- ddply(data, groupvars, .drop=.drop,
                .fun= function(xx, col, na.rm) {
                  c( N = length2(xx[,col], na.rm=na.rm),
                    mean = median (xx[,col], na.rm=na.rm), #cambie a mediana
                    sd = mad (xx[,col], na.rm=na.rm) #median absolute deviation
                  )
                },
                measurevar,
                na.rm
  )
  datac <- rename(datac, c("mean"=measurevar))
  datac$se <- datac$sd / sqrt(datac$N)
  ciMult <- qt(conf.interval/2 + .5, datac$N-1)
  datac$ci <- datac$se * ciMult
  return(datac)
}
##### función que hice para mostrar p-val de wilcoxon para cada rango
prueba_wilcox <- function(XX){
  XX$freqs <- as.factor(XX$freqs)
  splitteado <- split(XX, XX$freqs)
```

```

caribbean <- matrix(NA,length(levels(XX$freqs)),5)
for(banana in c(1:length(levels(XX$freqs)))){
  banana_split <- splitteado[banana]
  ice <- as.data.frame(banana_split)
  names(ice) <-c("Freq","condicion","potencia")
  Basal <- as.matrix(subset(ice, condicion == "basal", select=c("potencia")))
  T1 <- as.matrix((subset(ice, condicion == "T1", select=c("potencia"))))
  T2 <- as.matrix((subset(ice, condicion == "T2", select=c("potencia"))))
  T3 <- as.matrix((subset(ice, condicion == "T2", select=c("potencia"))))
  Lido <- as.matrix((subset(ice, condicion == "lido", select=c("potencia"))))
  resT1 <- wilcox.test(Basal, T1, alternative = c("two.sided"), mu = 0, paired = T, exact
= NULL, correct = F,conf.int = F, conf.level = 0.95)
  resT2 <- wilcox.test(Basal, T2, alternative = c("two.sided"), mu = 0, paired = T, exact
= NULL, correct = F,conf.int = F, conf.level = 0.95)
  resT3 <- wilcox.test(Basal, T3, alternative = c("two.sided"), mu = 0, paired = T, exact
= NULL, correct = F,conf.int = F, conf.level = 0.95)
  resL <- wilcox.test(Basal, Lido, alternative = c("two.sided"), mu = 0, paired = T,
exact = NULL, correct = F,conf.int = F, conf.level = 0.95)
  caribbean[banana,1] <- names(splitteado[banana])
  caribbean[banana,2] <- resT1$p.value
  caribbean[banana,3] <- resT2$p.value
  caribbean[banana,4] <- resT3$p.value
  caribbean[banana,5] <- resL$p.value
  #ahora graficar para probar que no sigue distribucion gaussiana:
  par(mfrow=c(3,5))
  qqnorm(Basal,main=c("Basal",names(splitteado[banana]))); qqline(Basal)
  qqnorm(Lido,main=c("Lido",names(splitteado[banana]))); qqline(Lido)
  qqnorm(T1,main=c("T1",names(splitteado[banana]))); qqline(T1)
  qqnorm(T2,main=c("T2",names(splitteado[banana]))); qqline(T2)
  qqnorm(T3,main=c("T3",names(splitteado[banana]))); qqline(T3)
}
  pirates <- as.data.frame(caribbean)
  names(pirates) <- c("rango",resT1$data.name,
resT2$data.name,resT3$data.name,resL$data.name)
  return(pirates)
}
##### función para acomodar los datos:
acomodar <- function(bla){
  bla$freqs <- factor(bla$freqs)
  tutiFresa <- melt(bla, id.vars=c("freqs"), measure.vars=c("basal","lido",
"T1","T2","T3"), variable.name="condicion", value.name="potencia")
  tutiFresa$potencia <- as.numeric(tutiFresa$potencia)
  return(tutiFresa)
}
##### para graficar puntos y errores estándar(Ee) ó median absolute deviations (MAD)
graff <- function(que, como,con, long){
  ggplot(que, aes(x=freqs, y=potencia, colour=condicion, group=condicion)) +
  geom_errorbar(aes(ymin=potencia-se, ymax=potencia+se), width=.1) +
  ggtitle(paste("Potencia de los N= ", long, " experimentos", sep="")) +
  geom_line() +
  geom_point() +
  xlab("Frecuencia (Hz)") +
  ylab(paste(como," de la Potencia(V^2/Hz) +/-",con, sep=""))
}
### Para determinar lo que es ruido
sacar_ruido <- function(archivo){
  freq <- archivo[1:nrow(archivo),6]
  B <- archivo[1:nrow(archivo),1]
  L <- archivo[1:nrow(archivo),2]
  B_L <- B - L
  frame_subs <- data.frame(freq,B_L); names(frame_subs) <- c("frecuencias", "resta")
  ruidosas <- subset(frame_subs, resta <= ruido, select="frecuencias")
  ruido <- as.matrix(ruidosas)
  return(ruido)
}
#Para eliminar las frecuencias con ruido:
sin_ruido <- function(preTuti, elim, long) {
  for(ttt in c(1:nrow(preTuti))){
    for(u in c(1:length(elim))){
      if(preTuti[ttt,7] == elim[u]){ #si esta frecuencia es de las
ruidosas de todos los archivos
preTuti[ttt, 3] <- c("eliminar") #la marco en T1 para

```

```

descartarla
    }}}
Tuti <- subset(preTuti, T1 != c("eliminar") ) #ya no incluye frecuencias donde
habia ruido
Tuti$freqs <- as.numeric(Tuti$freqs); Tuti$basal <-
as.numeric(Tuti$basal); Tuti$lido <- as.numeric(Tuti$lido); Tuti$T1 <-
as.numeric(Tuti$T1);Tuti$T2 <- as.numeric(Tuti$T2);Tuti$T3 <- as.numeric(Tuti$T3)
#Tambien hago rangos de frecuencias:
am <- c(1,4,8,15,40,60); botas=1; diego=0
backpack <- as.data.frame(matrix(NA,nrow(Tuti)*long,8))
for(I in c(1:5)){
  dora <- subset(Tuti, freqs>=am[I] & freqs<am[I+1])
  dora[8]<- paste(am[I],"-",am[I+1], "Hz",sep="")
  diego = diego + nrow(dora)
  backpack[botas:diego,1:8] <- dora[1:nrow(dora), 1:8]
  botas <- botas + nrow(dora)
}
names(backpack) <- c("basal","lido","T1","T2","T3","f","archi","freqs")
back <- subset(backpack, basal != "NA")
lista <- list(Tuti, back, elim)
names(lista) <- c("Tuti", "back", "elim")
return(lista)
}

##### COMIENZA EL PROGRAMA

# Los archivos deben tener todos los rangos de frecuencias
ruido <- 1e-17
archivos <- c("FEB09422.txt","FEB09128(3).txt",
"FEB09062_1.txt","FEB09062_2.txt","FEB09055_2.txt","FEB09056_1.txt")
filtro <- as.data.frame(matrix(NA,length(archivos),5)); names(filtro)<-
c("archivo","basal","lido","longitud","validacion"); filas <- nrow(read.table(archivos[1]));
con_ruido <-as.data.frame(matrix(NA,filas*length(archivos),7)) ; counter=1;
al=120;todas_ruidosas <- 0
#Tabla del poder(V2/Hz) en cada frecuencia (filas) para cada condición (columnas) del
experimento (Archivo)...
pdf("resultados_tesis5.pdf")
for(z in c(1:length(archivos))){
  tablina<-read.table(archivos[z],colClasses="numeric")
# Promedio en cada frecuencia de las 3 muestras 5seg/condicion:
cols=as.data.frame(matrix(NA,nrow(tablina),7))
names(cols)=c("freqs","basal","lido","T1","T2","T3","archi")
cols[1:nrow(tablina),1] <- tablina$V1
cols[1:nrow(tablina),2]<-(tablina$V2+tablina$V4+tablina$V6)/3
cols[1:nrow(tablina),3]<-(tablina$V8+tablina$V10+tablina$V12)/3
cols[1:nrow(tablina),4]<-(tablina$V14+tablina$V16+tablina$V18)/3
cols[1:nrow(tablina),5]<-(tablina$V20+tablina$V22+tablina$V24)/3
cols[1:nrow(tablina),6]<-(tablina$V26+tablina$V28+tablina$V30)/3
cols[1:nrow(tablina), 7] <- archivos[z]
#Filtro los experimentos con diferencia aparente entre Basal y Lidocaína en el rango
biológicamente relevante (1-60Hz):
bio <- subset(cols, freqs>=1 & freqs<60,
select=c("basal","lido","T1","T2","T3","freqs","archi"))
#vector filtro es para registrar la validacion de los archivos:
filtro[z, 1:4] <- c(archivos[z], sum(bio$basal),sum(bio$lido),nrow(bio) )
if(sum(bio$basal, na.rm = T) > (2*sum(bio$lido, na.rm = T))){
  filtro[z,5] <- "Si"
  boxplot(bio[1:nrow(bio), 1:5], main=c("Actividad cruda:",archivos[z],"1-
60Hz"), ls=2)
  #solo si el archivo es validado, saco las frecuencias con ruido
  freqs_ruidosas <- sacar_ruido(bio)
}
con_ruido[counter:al, 1:7] <- bio[1:nrow(bio), 1:7] #junta todos los
archivos leidos
names(con_ruido) <- c("basal","lido","T1","T2","T3","freqs","archi")
counter <- counter + nrow(bio)
al <- al + nrow(bio)
todas_ruidosas <- c(todas_ruidosas,freqs_ruidosas)#son las frecuencias ruidosas
}
#####
filtro #da la evaluacion de los archivos leidos
todas_ruidosas # da la lista de frecuencias ruidosas

```

```

con_ruido2 <- subset(con_ruido, freqs>1)
finales <- sin_ruido(con_ruido2, todas_ruidosas, length(archivos)) #se eliminan las
frecuencias ruidosas. Arroja $Tuti: la tabla de cada punto de frecuencia, $back: tabla de los
rangos de frecuencias, $elim: las frecuencias ruidosas
rango <- finales$back
cada_archi <- split(rango, rango$archi)
  todos_rangos <- rep(NA,7)
  for(a in c(1:length(archivos))){
    experimento <- cada_archi[a]; experimento <- as.data.frame(experimento);
names(experimento) <-c("basal","lido","T1","T2","T3","f","archi","freqs")
    cada_banda <- split(experimento, experimento$freqs)
    suma_bandas <- matrix(NA, 5,7)
    for(r in c(1:5)){
      banda <- cada_banda[r]; rango <- as.data.frame(banda); names(rango) <-
c("basal","lido","T1","T2","T3","f","archi","freqs"); rango$lido <- as.numeric(rango$lido);
rango$T1 <- as.numeric(rango$T1); rango$T2 <- as.numeric(rango$T2);rango$T3 <-
as.numeric(rango$T3)
      suma_bandas[r,2:7] <-
c(sum(rango$basal),sum(rango$lido),sum(rango$T1),sum(rango$T2),sum(rango$T3),names(cada_archi[
a]))
      suma_bandas[r,1] <- names(cada_banda[r])
    }
    todos_rangos <- rbind(todos_rangos, suma_bandas)
  }
sumas_rangos<- data.frame("freqs"=NA, "basal"=NA,"lido"=NA,"T1"=NA,"T2"=NA,"T3"=NA,"archi"=NA)
sumas_rangos[1:nrow(todos_rangos)-1,1:7] <- todos_rangos[2:nrow(todos_rangos),1:7]

##### graficar:
### primero los datos con la media
cada_archi <- split(sumas_rangos, sumas_rangos$archi)
map<-0
for(z in c(1:length(archivos))){
compass <- acomodar(cada_archi[z])
map <- rbind(map,compass)
}
mapa <- map[2:nrow(map),1:3]
rangos <- summarySE(mapa, measurevar="potencia", groupvars=c("freqs","condicion"))
rangos$freqs <- factor(rangos$freqs, levels = c("1-4Hz","4-8Hz", "8-15Hz","15-40Hz","40-
60Hz"))
graff(rangos, "promedio","EE", length(archivos))
### luego los datos con la mediana
medios_rangos <- mediana(mapa, measurevar="potencia", groupvars=c("freqs","condicion"))
medios_rangos$freqs <- factor(medios_rangos$freqs, levels = c("1-4Hz","4-8Hz", "8-15Hz","15-
40Hz","40-60Hz"))
graff(medios_rangos, "mediana", "MAD", length(archivos))
#####ESTADISTICA:
prueba_wilcox(mapa)
dev.off()

```

16.2 Ecuaciones de la simulación del sistema:

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}[LGA] &= -(K_{dg1})[LGA] - LGA_{nov} - LGA_{dim} \\ \frac{d}{dt}[LGA_{dim}] &= (K_{f2})^2[LGA]^2[Cou] - (K_{r2})^2[LGA_{dim}] \\ \frac{d}{dt}[mtTA] &= G * Kt * fv\left(\left(b + (1 - b) \frac{[LGA_{dim}]^n}{12(K_{LGA})^n + [LGA_{dim}]^n}\right) + (b + (1 - \right. \\ &\left. b) \frac{[tTA]^n}{12(K_{TTA})^n + [tTA]^n}\right) - K_{dg3}[mtTA] \\ \frac{d}{dt}[tTA] &= K_{tra}[mtTA] - K_{dg4}[tTA] \\ \frac{d}{dt}[mGFP] &= G * Kt * fv\left(\left(b + (1 - b) \frac{[tTA]^n}{12(K_{TTA})^n + [tTA]^n}\right) - K_{dg5}[mGFP] \right) \\ \frac{d}{dt}[GFP] &= K_{tra}[mGFP] - K_{dg6}[GFP] \\ \frac{d}{dt}[LGA_{nov}] &= K_{f7}([Nov][LGA] + [Nov][LGA_{dim}]) - K_{r7}[LGA_{nov}] \\ \frac{d}{dt}[Cou] &= -K_{dg8}[Cou] \\ \frac{d}{dt}[Cou] &= -K_{dg9}[Nov] \end{aligned}$$

### 16.3 Porcentajes obtenidos del conteo celular:

<b>Experimento</b>	<b>Exp1</b>	<b>Exp2</b>	<b>Exp3</b>	<b>Exp4</b>	<b>Exp5</b>	<b>Exp6</b>	<b>Exp7</b>
<b>Protocolo</b>	#1	#1	#1	#2	#3	#3	#3
<b>Placa</b>	96 pozos	24 pozos	24 pozos				
<b>Eficiencia de transfección</b>	41.98%	37.82%	42.67%	26.73%	53.49%	41.93%	38.75%
<b>Tiempo de diferenciación de pre-inducción</b>	40 hrs	40 hrs	40 hrs	65 hrs	12 hrs	12 hrs	12 hrs
<b>Tiempo de Inducción</b>	1 hr	1 hr	1 hr	1hr	22 hrs	22 hrs	22 hrs
<b>Tiempo de evaluación post-inducción</b>	6 hrs	6 hrs	6 hrs	22 hrs	22 hrs	22 hrs	22 hrs
<b>% de Células EGFP(+) inducidas con NGF</b>	3.86	1.43	4.12	3.12	19.80	2.58	9.58
<b>% de Células EGFP(+) no inducidas</b>	2.35	0	2.54	0.94	10.78	0.27	1.31
<b>% de la expresión basal</b>	164.17	142.80	162.26	331.91	183.68	943.96	728.29

