



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

**ANÁLISIS DE MARCADORES DE PLASTICIDAD
SINÁPTICA Y FUNCIONAL EN EL GIRO DENTADO DE
RATAS ADULTAS POSTERIOR A LA INFUSIÓN
INTRAHIPOCAMPAL DE ÁCIDO KAÍNICO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

LICENCIADA EN PSICOLOGÍA

P R E S E N T A :

MARÍA FERNANDA LÓPEZ HERNÁNDEZ

DIRECTORA: DRA. ANGÉLICA ZEPEDA RIVERA



CIUDAD UNIVERSITARIA, MÉXICO D.F.

2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A Alberto

*Oh we're absolute beginners
With nothing much at stake
As long as you're still smiling
There's nothing more I need
I absolutely love you
But we're absolute beginners
But if my love is your love
We're certain to succeed*

From F to A

AGRADECIMIENTOS:

A la Dra. Clorinda Arias por sus valiosos consejos para el desarrollo de este proyecto, y por darme la oportunidad de formar parte de su laboratorio.

A la Dra. Angélica Zepeda, gracias por su apoyo, ánimos y palabras cuando las cosas parecían perdidas. Por enseñarme por primera vez como es hacer ciencia. Por fomentar mi desarrollo académico y personal. Por enseñarme que no hay nada más valioso en esta vida que hacer lo que más nos apasiona.

A los miembros del sínodo, por sus valiosas contribuciones en la revisión del presente trabajo:

Dr. Jaime Eduardo Calixto González

Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina

Dr. Octavio César García González

Dra. María Guadalupe Flores Cruz

Al Dr. Octavio García por su siempre gran apoyo y por introducirme por primera vez al mundo de las Neurociencias con sus magníficas pláticas y simposios.

Agradecimiento académico a la Q.F.B Patricia Ferrera por su apoyo y guía técnica en la metodología de la presente investigación.

A Alejandra Aguayo, por su apoyo constante, consejos, guía y enseñanzas. Por ser un ejemplo como investigadora y como amiga.

A mis compañeros del laboratorio que ahora considero mi familia, mil gracias por el apoyo incondicional, los ánimos, las risas, lecciones y vivencias que no cambiaría por nada en el mundo. Son increíbles y son un orgullo.

A mis maestras Jedi, Andrea y Evita, por su amor, por escucharme y enseñarme todo lo que se. Por ser más que mis amigas, las considero mis hermanas. Por las risas, las excelentes noches de baile, abrazos, ánimos, pláticas y los tiempos difíciles en los que siempre estuvieron a mi lado. Porque son lo mejor que me ha pasado en la vida, mil gracias por todo, las adoro y amo.

A mis puerquitas Alexia y Carin por su gran apoyo, oído y paño de lágrimas, pero también por las miles de risas. Muchas gracias por ser como son.

A mis amigos de la vida Andrea Villegas, Karen López, Vale Sosa y Alberto Vázquez por seguir estando a mi lado todos estos años. Los quiero mucho.

A Alberto Vázquez por su apoyo incondicional, palabras de aliento, ánimos, noches de desvelos y abrazos que siempre me impulsaron a dar ese brinco para lograr mis objetivos. Por ser mi compañero de vida y por crecer juntos.

En especial, gracias a mi familia por su enorme apoyo, palabras y enseñanzas, pero sobre todo por creer en mí y por su enorme amor.

El presente trabajo se realizó en el departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Angélica Zepeda Rivera. El trabajo se llevó a cabo con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología proyecto 176589 y con el apoyo del programa de Becas de Titulación otorgada por la Secretaría de Educación Pública.

ÍNDICE

1.	Resumen	1
2.	Introducción	3
2.1	Plasticidad Nerviosa	3
2.2	Plasticidad posterior al daño del Sistema Nervioso Central (SNC)	4
2.3	El papel de la Plasticidad en la Neuroreparación	8
2.4	El giro dentado como estructura plástica	9
3.	Justificación	13
4.	Hipótesis	
5.	Objetivo	13
5.1	Objetivos particulares	13
6.	Materiales y Métodos	14
6.1	Sujetos	14
6.2	Cirugía estereotáxica	14
6.3	Grupos experimental	15
6.4	Protocolos conductual	15
6.4.1	Manipulación y Habitación	16
6.4.2	Condicionamiento Aversivo Contextual (CAC)	16
6.4.3	Memoria Aversiva Contextual (MAC)	17
6.4.4	Tarea de Exploración	18
6.5	Evaluación de contenido de proteína por Western blot	18
6.6	Tinción de Nissl	20
6.7	Análisis estadístico	21
7.	Resultados	21
7.1	Pruebas conductuales	21
7.2	Alcance del ácido kaínico en la formación hipocampal y en el giro dentado	25

7.2.1	Expresión proteica de NeuN en giro dentado	25
7.2.2	Tinción de Nissl del hipocampo	26
7.3	Contenido proteico mediante Western blot de moléculas reporteras de plasticidad	27
7.3.1	Expresión proteica de Sinaptofisina (SYP)	27
7.3.2	Expresión proteica de Densidad Postsináptica 95 (PSD-95)	32
7.3.3	Expresión proteica del IEG asociado a la actividad regulada por el citoesqueleto (Arc)	36
8.	Discusión	41
8.1	Modificación en proteínas sinápticas y funcionales posterior a una tarea de exploración y al paradigma de MAC	42
8.2	Modificación en proteínas sinápticas y funcionales a lo largo del tiempo (10días y 30días) posterior a la infusión de ácido kaínico	44
8.3	Modificación en proteínas sinápticas y funcionales posterior a la infusión intrahipocampal de ácido kaínico (AK)	45
9.	Conclusiones	47
10.	Referencias	49

ABREVIATURAS

ACSF: Líquido cefalorraquídeo artificial

AK: Ácido Kaínico.

Arc: proteína del citoesqueleto regulada por actividad (“Activity regulated cytoskeletal protein”).

CAC: Condicionamiento Aversivo Contextual.

CC: Con condicionamiento.

CE: Corteza Entorrinal.

CG: Capa Granular.

CH: Contralateral.

D.O: Densidad Óptica.

d AK: Días posterior a la infusión de AK.

d Sham: Días posterior a la introducción de cánula.

GD: giro dentado.

H: Hilus.

HI: Hemisferio ipsilateral.

Explora: Tarea de Exploración

IEGs: Genes de expresión temprana (“Immediately early genes”)

MAC: Memoria Aversiva Contextual.

PSD: Densidad postsináptica (Post Synaptic Density).

PSD-95: Proteína de la Densidad Postsináptica 95 (“Postsynaptic Density protein 95”).

SAP90: Proteína asociada a la sinapsis 90 (“Synapse-associated Protein 90”)

SNC: Sistema Nervioso Central.

SB: Solución de bloqueo.

SYP: Sinaptofisina.

TA: Temperatura ambiente.

TA: Vía Temporoamónica.

TN: Toda la noche.

VP: Vía Perforante.

VPL: Vía Perforante Lateral.

VPM: Vía Perforante Medial.

VS: Vesículas Sinápticas.

1. RESUMEN

El cerebro del mamífero es un órgano plástico, ya que las células que lo componen tienen la capacidad de responder de forma dinámica al ambiente, a la experiencia y al daño mediante la modificación de los circuitos neurales. El hipocampo es una estructura con alta capacidad de modificarse y en la que ocurren cambios continuos como respuesta a procesos de aprendizaje y memoria, así como a eventos patológicos. Las neuronas del hipocampo son susceptibles al daño excitotóxico, el cual ocurre como denominador común en eventos como el daño isquémico, crisis epilépticas o traumatismos craneoencefálicos. La afección a una región particular del hipocampo compromete el funcionamiento de toda la estructura, ya que las subregiones que lo componen están conectadas entre sí. Cada subregión del hipocampo, CA1, CA3 y giro dentado (GD) responde ante demandas cognitivas particulares; así por ejemplo, el GD media la memoria contextual. Aun cuando nuestro grupo y otros han mostrado que el GD tiende a reorganizarse a nivel celular posterior a una lesión, se desconoce la regulación de mecanismos más sutiles de plasticidad, como la regulación de proteínas asociadas a la plasticidad sináptica y funcional del giro dentado ante una demanda cognitiva particular como la inducción de la memoria contextual o ante una tarea de exploración. El presente trabajo tuvo por objetivo evaluar, a través del análisis de contenido de proteína, la plasticidad sináptica y funcional de las células del giro dentado en respuesta a una demanda conductual y en consecuencia al daño hipocampal. Para ello, se realizó una infusión excitotóxica hipocampal por medio de la inyección intracerebral de 0.75nM de ácido kaínico (AK), y 10 o 30 días posteriores a la infusión se indujo la activación del GD del hipocampo por medio de una de dos tareas: exploración y evocación espacial o condicionamiento y memoria aversiva contextual. Inmediatamente después de inducir el reconocimiento espacial o el recuerdo aversivo contextual, se sacrificó a los animales y, por medio de electroforesis y análisis de contenido de proteína, se evaluó la expresión de diversas proteínas sinápticas como Sinaptofisina (SYP), de la Densidad Postsináptica 95 (PSD-95) o por sus siglas en inglés "Postsynaptic Density 95", así como de la proteína asociada a la activación funcional, Arc (por sus siglas en inglés "activity regulated cytoskeletal protein" o proteína del citoesqueleto regulada por actividad). En condiciones fisiológicas, la evocación de la memoria aversiva contextual, tarea propia del

GD, no se acompaña de modificaciones significativas en los niveles del contenido de proteínas sinápticas, como SYP, PSD-95 o Arc en comparación con los grupos sometidos a una tarea de exploración. Los niveles de las proteínas SYP y Arc mostraron un aumento hacia los 30 días después de la infusión de AK con respecto a los grupos evaluados a 10 días post tratamiento en la condición de exploración espacial. Estos datos sugieren que como consecuencia de un proceso excitotóxico, las células del GD sufren modificaciones a nivel sináptico y funcional como parte del repertorio de respuestas asociadas al reorganización neuronal post daño y de cara a demandas cognitivas específicas.

2. INTRODUCCIÓN

A principios del siglo XX prevalecía la idea del cerebro como una estructura estable e inmodificable. El anatomista Santiago Ramón y Cajal consideraba que en el sistema nervioso central (SNC) adulto “una vez terminado el desarrollo, las fuentes de crecimiento y regeneración de axones y dendritas se agotan irrevocablemente. En el cerebro adulto, las vías nerviosas son fijas e inmutables; todo puede morir, nada puede regenerarse” (Brailowsky, 1998; Azmitia, 2007). Sin embargo, estudios subsecuentes al postulado de Cajal hacen explícita la capacidad del SNC para alterar su estructura y función a lo largo de la vida, sustituyendo la visión tradicional de un sistema adulto estático por la de un sistema en el que ocurren modificaciones dinámicas en respuesta a eventos intrínsecos y extrínsecos, es decir, un sistema adulto plástico (Nudo, 2006).

2.1 *Plasticidad Nerviosa.*

La plasticidad nerviosa se refiere al conjunto de cambios estructurales y funcionales que involucran tanto alteraciones en la fuerza de las conexiones existentes, como en el establecimiento de nuevas conexiones neurales o sinaptogénesis (Ding *et al.*, 2005). En el cerebro, estos eventos ocurren de manera continua durante las primeras etapas del desarrollo ontogénico, pero también ocurren en el adulto en respuesta a modificaciones en el medio ambiente como a la exposición a ambientes enriquecidos, al ejercicio y en respuesta a procesos cognitivos como el aprendizaje y la memoria, y también como consecuencia al daño cerebral (Nudo, 2006).

La plasticidad nerviosa tiene manifestaciones diversas que incluyen cambios a nivel molecular y celular, y que impactan a nivel de circuitos. Estas manifestaciones pueden formar parte tanto de un repertorio de adaptación que despliega el sistema nervioso en condiciones fisiológicas, como de daño. Sin embargo, en condiciones patológicas, el sistema también puede desplegar respuestas maladaptativas.

Algunas de las respuestas plásticas adaptativas del sistema nervioso incluyen la síntesis y liberación de factores neurotróficos, así como de neurotransmisores, aumento y disminución de receptores postsinápticos, sinaptogénesis, neurogénesis y desarrollo de

nuevas redes neurales como resultado del rebrote axonal y dendrítico, entre otras (Deller y Frotscher, 1997; Bidmon *et al.*, 1998; Zepeda *et al.*, 2004).

2.2 Plasticidad posterior al daño del sistema nervioso central.

En mamíferos, el potencial para la neuroreparación subyace en la plasticidad, permitiendo una recuperación estructural y funcional en varias regiones cerebrales en condiciones posteriores a daño.

En un proceso de daño cerebral ocurren diversos eventos, que incluyen el desequilibrio iónico, la disfunción y muerte celular, la proliferación celular y vascular, así como respuestas maladaptativas o adaptativas de las células que incluyen cambios anatómicos y bioquímicos de las células remanentes. Cuando las modificaciones adaptativas sobresalen, éstas pueden conducir a la reorganización funcional de la región dañada (Fig. 1).

Un ejemplo de plasticidad adaptativa es aquel en el que la corteza cerebral se reorganiza posterior a un daño. En primates, la lesión cortical de la región encargada de la representación del dedo pulgar conduce a la reorganización de los mapas corticales de tal representación, que se extiende a áreas adyacentes (Merzenich *et al.*, 1983; Nudo, 2006). De esta forma, algunos grupos de células que no estaban inicialmente asociadas a la función del dedo pulgar, modifican sus respuestas permitiendo la recuperación funcional. La reorganización en las respuestas de las células remanentes a un proceso de daño ha sido extensamente documentada y se considera una de las expresiones de plasticidad que pueden conducir a la neuroreparación (Jenkins y Merzenich, 1987; Nudo y Milliken 1996; Zepeda *et al.*, 2004; Cheatwood *et al.*, 2008).

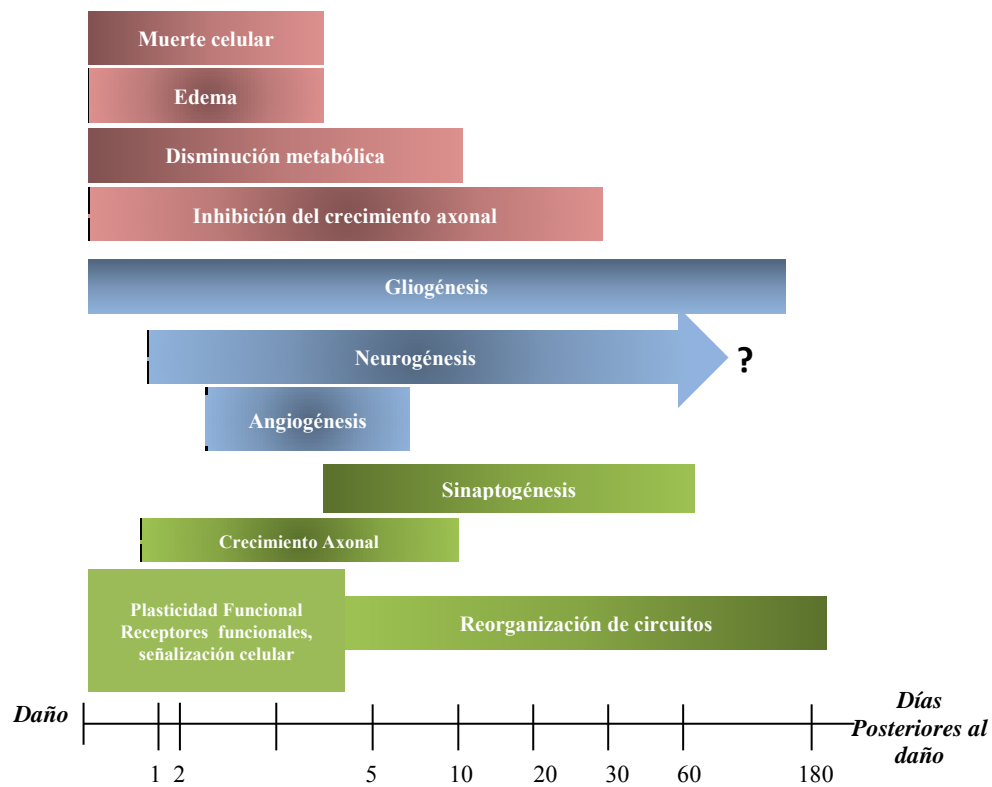


Figura 1. Algunos procesos asociados al daño cerebral. La secuencia temporal de los acontecimientos se muestra a lo largo de una línea de tiempo esquematizada hasta los 180 días después de daño. El sombreado más oscuro destaca la intensidad máxima del mecanismo específico. Procesos iniciales para la recuperación se muestran en color rosa. Los procesos de génesis de células se muestran en color azul, mientras que las que subyacen a la plasticidad adaptativa se muestran en verde (Modificado de Wieloch y Nikolich, 2006).

En un proceso de lesión se presentan modificaciones en la organización celular que subyacen diferentes cambios neuroanatómicos. Algunas de estas modificaciones se expresan en cambios a nivel del citoesqueleto de neuronas remanentes que pueden dar lugar a la elongación axónica y a un aumento en la arborización dendrítica (Jones *et al.*, 1992; Darian-Smith y Gilbert, 1994), así como también a la reorganización de la estructura sináptica como es la regeneración presináptica o postsináptica que puede culminar en sinaptogénesis (Briones *et al.*, 2006) o que puede implicar la modulación en la neurotransmisión excitadora e inhibitoria (Zepeda, 2004).

Una de las tantas formas que dan lugar a la remodelación sináptica es la sinaptogénesis o generación de nuevas sinapsis. En el desarrollo, la sinaptogénesis se produce durante un período prolongado, comenzando durante la embriogénesis y extendiéndose hasta el período postnatal, aproximadamente al día 90 en el hipocampo de los roedores. El proceso está mediado por interacciones célula-célula que controlan diferentes procesos celulares en

una secuencia jerárquica altamente orquestada de eventos que median la competencia, colocación, composición, tamaño y estabilidad de las sinapsis funcionales (Waites *et al.*, 2005). La sinaptogénesis también ocurre en el adulto, y se le reconoce como un sustrato del aprendizaje y la memoria (Waites *et al.*, 2005).

Existen moléculas que se han empleado como reporteras de modificaciones estructurales y sinápticas; una de estas moléculas es la proteína Sinaptofisina (SYP). La SYP es una glicoproteína asociada a la membrana de vesículas sinápticas (VS), presentes en los botones presinápticos de axones. Se ha propuesto que esta proteína es necesaria para el anclaje y reciclaje de VS (Valtorta *et al.*, 2004), y su expresión se ha empleado ampliamente como correlato de formación de sinapsis tanto en procesos de memoria (Nithianantharajah y Murphy, 2008), como en procesos de daño. Thompson y colaboradores (2006), demostraron un aumento de la proteína SYP en el hipocampo 24 horas posteriores a un traumatismo craneoencefálico moderado en la corteza cerebral de ratas, mismo que se mantuvo hasta 21 días posteriores al trauma, lo que sugería cambios en la formación de nuevas sinapsis posterior al daño.

Otra proteína que se sabe tiene un papel fundamental en la modificación de la ultraestructura sináptica es la Proteína de la Densidad Postsináptica-95 (PSD-95) por sus siglas en inglés “*Postsynaptic Density 95*”o también conocida como SAP90 (por sus siglas en inglés “*Synapse-associated Protein 90*”) (Kim *et al.*, 1998; Xu, 2011). Esta es una proteína de andamiaje que se encuentra de forma abundante en la densidad postsináptica (PSD) de botones dendríticos. PSD-95 es miembro de la familia asociada a la membrana guanilato cinasa (MAGUK), es una de las proteínas más abundantes en la densidad postsináptica y se ha propuesto que regula diversos aspectos de la transmisión sináptica, ya que se acopla y coordina múltiples vías que regulan la estructura y función sináptica. De su expresión se ha visto que dependen diferentes tipos de memoria dependientes del hipocampo como la memoria de lugar y la memoria aversiva contextual (Migaud *et al.*, 1998; Nagura *et al.*, 2012).

La expresión a la alta o a la baja de estas proteínas puede proveer un correlato sobre la plasticidad sináptica como sustrato en la reorganización neuronal posterior a un daño.

Otro correlato molecular de la plasticidad nerviosa es la expresión de genes de expresión temprana neurales (IEGs, por sus siglas en inglés, “*immediate early genes*”), los cuales codifican para factores de transcripción, para proteínas de citoesqueleto y otras proteínas implicadas en la traducción de señales. Uno de los IEGs que resultan de particular interés en el ámbito de la reorganización y neuroreparación es *arc* (gen asociado a la actividad regulada por el citoesqueleto), ya que puede modular cambios en el citoesqueleto neuronal y que se expresa a nivel de la sinapsis, confiriéndole un papel importante tanto en la remodelación estructural, como en la funcional. Tanto el ARNm de *arc*, como el producto proteico (Arc) están presentes en dendritas y se enriquecen en el sitio de la actividad sináptica local, lo que sugiere que Arc también se sintetiza localmente mediando modificaciones del citoesqueleto dendrítico en sinapsis “activas” (Lyford *et al.*, 1995; Lanahan y Worley, 1998; Bramham *et al.*, 2008; Bramham *et al.*, 2010).

La expresión de Arc se ha asociado a la modulación de otras proteínas reporteras de eventos plásticos, ya que su síntesis se requiere para la estabilización y expansión de proteínas como F-actina (proteínas globulares que forman los microfilamentos del citoesqueleto), que promueve el mantenimiento o consolidación de la LTP y su expresión se requiere también para mantener la fosforilación de la proteína cofilina que está asociada a la familia de las actinas (Messaoudi *et al.*, 2007).

Asimismo, se ha observado que Arc co-inmunoprecipita con PSD-95 lo cual podría indicar una actividad de modulación sobre la expansión de la PSD de las neuronas activas (Lyford *et al.*, 1995). De esta manera, la presencia de Arc sugiere un estado de activación neuronal y un estado dinámico del citoesqueleto, necesario en un proceso plástico, evidenciando el papel de Arc como una proteína clave en el proceso de plasticidad neuronal.

En términos funcionales, se ha planteado que la expresión de Arc se requiere para que ocurran eventos de plasticidad sináptica de largo plazo pues en estudios *in vivo* en el GD se ha demostrado que su inhibición específica perjudica el mantenimiento, pero no la inducción de la LTP (Guzowski *et al.*, 2000). Se ha demostrado el papel que juega la síntesis de Arc en la formación de diversas formas de memoria dependientes e independientes del hipocampo, incluyendo el paradigma de exploración (Ramírez-Amaya *et al.*, 2005), laberinto espacial de Morris, en la tarea de reconocimiento de objeto, en la

aversión condicionada al sabor (Morin *et al.*, 2011), y en el condicionamiento aversivo contextual (Plath *et al.*, 2006; Besnard *et al.*, 2012; Chia y Otto, 2013).

El daño hipocampal en cualquiera de las regiones que lo componen desencadena un proceso patológico excitotóxico característico de diversas patologías como epilepsia, enfermedades neurodegenerativas y eventos isquémicos. La excitotoxicidad se refiere a la muerte neuronal provocada por la activación sostenida de receptores de aminoácidos. El neurotransmisor excitador principal en el cerebro y en la médula espinal es el ácido glutámico.

2.3 El papel de la plasticidad nerviosa en la neuroreparación.

Estudios que se han realizado en nuestro laboratorio, y dentro de los cuales se engloba el presente proyecto, han mostrado que la infusión del análogo del kainato, el Ácido Kaínico (AK), en concentraciones no epileptogénicas en el giro dentado (GD), induce muerte por excitotoxicidad, provocando el daño de neuronas en el área; de la misma manera, esta estructura muestra un grado de reorganización morfológica a lo largo del tiempo posterior al daño (Hernández-Ortega *et al.*, 2007). Estudios subsecuentes mostraron que el GD no solo se reorganiza morfológicamente sino que en las primeras etapas del proceso hay un aumento de células precursoras neuronales y de neuronas jóvenes en proceso de migración. Así mismo, se mostró que la capa granular del GD se repuebla después de una lesión por AK y que la reorganización estructural correlaciona en el tiempo con la recuperación de la función de la memoria contextual y con la restauración *in vivo* del LTP en la vía de la GD-CA3 (Liquitaya-Montiel *et al.* 2012; Zepeda *et al.*, 2013).

Esta evidencia establece una correlación temporal entre los eventos estructurales que ocurren en el área de la lesión y zonas aledañas con la recuperación funcional del área dañada. Como parte del proceso plástico posterior al daño, cabe la posibilidad de que tanto en las neuronas remanentes, como en aquellas que se generaron después de una lesión, modifiquen la expresión de algunas proteínas asociadas a la reorganización sináptica, como a su funcionalidad. Sin embargo, esta posibilidad no se exploró y constituye el tema fundamental de esta tesis.

2.4 El giro dentado como estructura plástica.

El hipocampo es una estructura subcortical que se divide, con base a su composición celular y su conectividad, en los Cuernos de Ammón CA1, CA3, hilus y el GD. La formación hipocampal incluye también estructuras vecinas como el subículum y la Corteza Entorrinal. El hipocampo conforma un circuito tri-sináptico, en donde el GD recibe información de las cortezas de asociación, la corteza entorrinal lateral y medial hacia las células granulares del GD. Los axones de las células granulares del GD a su vez, establecen sinapsis con las neuronas de CA3, y éstas a su vez con las de CA1. Las señales no se propagan de forma unidireccional, sino que viajan de manera bidireccional entre las sub-regiones que integran la vía (Schwartzkroin *et al.*, 1990; Scharfman, 2007) (Fig. 2).

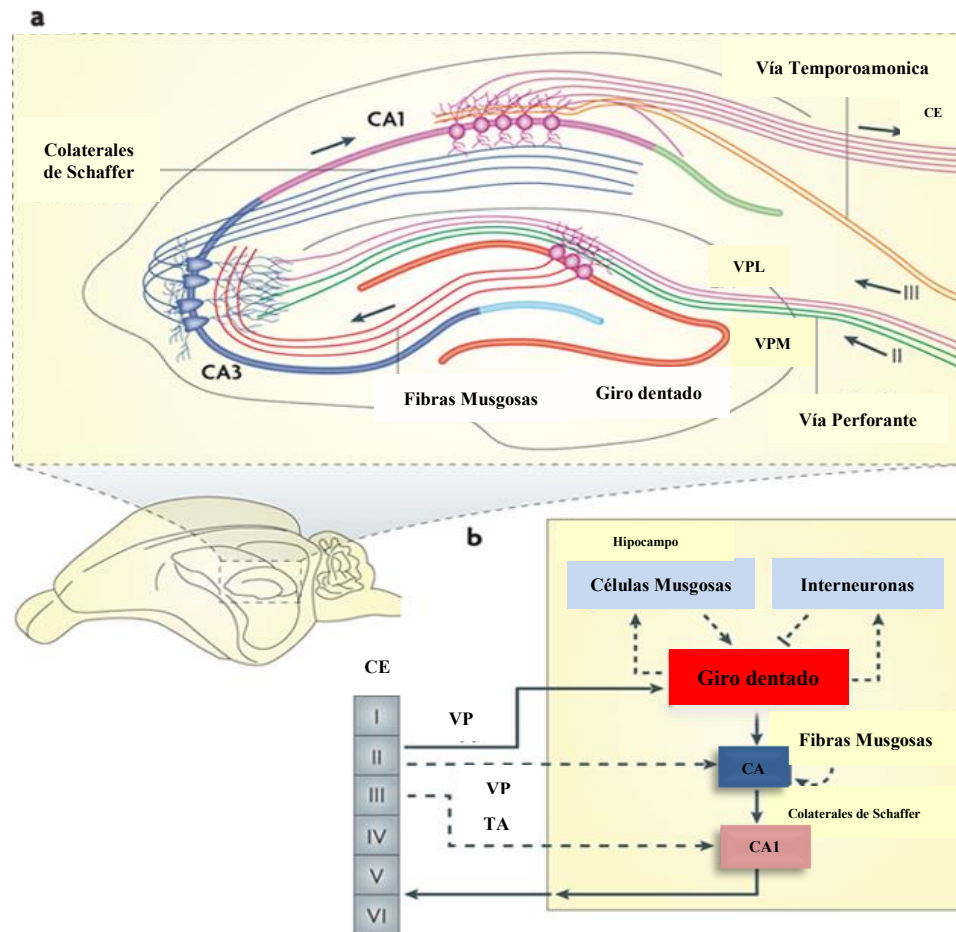


Figura 2. Ilustración del Circuito Hipocampal en roedor. a) Diagrama del circuito hipocampal. b) Diagrama de la red neuronal del hipocampo. Se observa la vía tri-sináptica excitatoria del hipocampo (Corteza Entorrinal (CE)-(giro dentado) GD-CA3-CA1-EC) representado por las flechas sólidas. Los axones de neuronas de la capa II de la CE proyectan al GD por la vía perforante (VP) incluyendo la vía perforante lateral (VPL) y medial (VPM). El GD envía sus proyecciones a CA3 por medio de las fibras musgosas. CA3 envía la información por las colaterales de Schaffer a CA1 y esta a su vez la envía a las capas profundas de la CE. CA3 también recibe información de la CE por medio de la VP, CA1 también recibe entradas de la CE a través de la vía Temporoamónica (TA). El GD también envía proyecciones a las células Musgosas del hilus y a interneuronas que a su vez envían proyecciones inhibitorias y excitatorias de regreso a las células granulares del GD (Modificado de Deng *et al.*, 2010).

El GD está organizado de forma trilaminar. Su capa más externa se denomina capa molecular y se encuentra libre de cuerpos celulares; ésta se compone de las dendritas de las células granulares que reciben información proveniente de la Corteza Entorrinal a través de los axones que conforman la vía Perforante. La capa media es la capa granular que está compuesta de los cuerpos de las células granulares cuyos axones proyectan a la región CA3 y; bajo la capa granular se encuentra la denominada zona subgranular (ZSG). Debajo de

esta se encuentra la región del hilus, compuesto por varios tipos neuronales, entre las más comunes se encuentran las llamadas células musgosas, que son neuronas excitadoras caracterizadas por tener un denso árbol dendrítico que proyectan sus axones a la capa molecular del GD ipsi y contralateral (Anderson, 2007; Treves *et al.*, 2008) (Fig. 3).

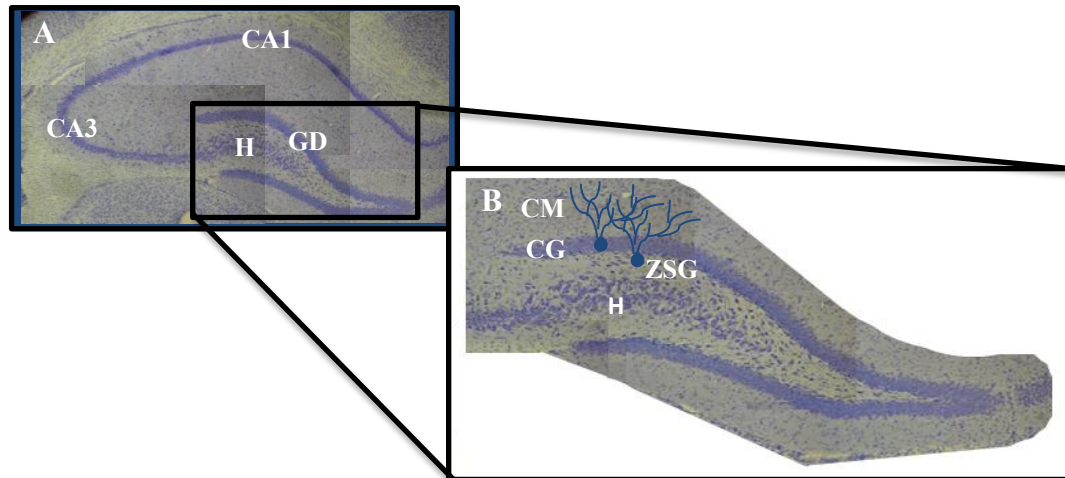


Figura 3. Capas que conforman el giro dentado. A) Imagen de sección coronal teñida con Violeta de Cresilo donde se muestran las regiones que conforman el hipocampo. Giro dentado (GD) Hilus (H), los cuernos de Ammón 2 y 3 (CA1, CA3). B) Acercamiento del GD, y las capas que lo componen; su capa más externa Capa Molecular (CM), capa media es la Capa Granular (CG), bajo la capa granular se encuentra la zona denominada Zona Subgranular (ZSG en imagen) y la región del hilus (H)

El GD es una estructura altamente plástica pues las células que lo componen sufren alteraciones bioquímicas y morfológicas continuas que subyacen algunas formas de aprendizaje y la memoria. De la integridad de esta estructura depende que ocurran procesos como la separación de patrones, función que le permite a un individuo reconocer patrones coincidentes en un espacio. Una de las manifestaciones más evidentes de la separación de patrones es la memoria contextual (Hernández- Rabaza *et al.*, 2008; Maren *et al.*, 2012).

La memoria contextual le permite al organismo identificar aspectos específicos de un ambiente y como resultado, puede detectar eficientemente un lugar conocido, y asociar la ocurrencia de eventos al contexto (Maren *et al.*, 2012). Una aproximación experimental para evaluar este tipo de memoria es el Condicionamiento Aversivo Contextual (CAC), en el que un estímulo aversivo (descarga eléctrica) se asocia a un contexto específico (cámara o caja de condicionamiento). Al ser expuesto nuevamente al contexto, en ausencia al

estímulo aversivo, el sujeto recuerda el ambiente y despliega una conducta de miedo que se traduce como inmovilidad. Dicha inmovilidad ocurre en condiciones fisiológicas; sin embargo, cuando el GD ha sido lesionado, el sujeto puede mostrar una alteración en el recuerdo del contexto aversivo en cuyo caso la inmovilidad disminuye (Hernández- Rabaza *et al.*, 2008; Zepeda *et al.*, 2013).

Otra tipo de tarea espacial en la el hipocampo se encuentra involucrado es la tarea de exploración espacial, que se basa en la conducta innata de los roedores de explorar ambientes. Se ha reportado que, en roedores, esta tarea induce patrones de disparo específicos en alrededor del 40% de las células piramidales de la región CA1 e induce también la transcripción y traducción del gen reportero de actividad, Arc (en CA1, CA3 y corteza parietal De la misma forma se observa expresión de Arc en el GD en menor medida, sin embargo, su expresión tiene una duración de hasta 8 hrs (Ramírez- Amaya *et al.*, 2005).

Las neuronas del hipocampo tienen una alta densidad de receptores glutamatérgicos del tipo kaínato, lo que la hace una estructura altamente sensible a eventos excitotóxicos. A nivel experimental, uno de los modelos de excitotoxicidad mejor caracterizados es la administración intraperitoneal e intracerebral de AK (monohidrato del ácido acético-2-cardoxi-4-isopropionil-3-pirrolidinil). Éste es un análogo no degradable del ácido glutámico y agonista de los receptores AMPA/kaínato que promueve la despolarización y entrada de sodio, lo que a su vez activa receptores NMDA permitiendo la entrada masiva de calcio a las neuronas y provocando su muerte. (Revisado en Aguilar- Arredondo, 2011).

La excitotoxicidad se caracteriza por un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno, que altera las funciones mitocondriales de la célula e induce muerte celular vía excitotóxica y apoptótica. La excitotoxicidad es un evento común a patologías como crisis epilépticas, isquemias y en traumatismos craneoencefálicos (revisado en Aguilar- Arredondo, 2011).

A partir de las ideas anteriormente expuestas, en este proyecto se planteó analizar en el GD la expresión temporal del contenido de proteínas funcionales, como Arc y proteínas

sinápticas, como PSD95 y SYP en consecuencia a un evento excitotóxico hipocampal y en respuesta a diferentes tareas cognitivas asociadas al giro dentado.

3. JUSTIFICACIÓN

El hipocampo es una estructura, cuyo funcionamiento depende de la integridad de todas las regiones que lo componen. Está bien establecido que como consecuencia de procesos de aprendizaje, memoria y daño el hipocampo presenta plasticidad celular. Sin embargo, se desconoce si como parte del repertorio de respuestas plásticas que ocurren después de una lesión y ante una demanda cognitiva, las células hipocampales presentan una expresión diferencial a nivel de proteínas a funcionalidad y sinaptogénesis.

4. HIPÓTESIS

El daño excitotóxico al hipocampo de ratas adultas inducirá una modulación diferencial en el tiempo de proteínas sinápticas y funcionales, asociadas a plasticidad, en respuesta a una demanda cognitiva.

5. OBJETIVO

Analizar modificaciones en la expresión de marcadores de plasticidad sináptica y funcional en el GD de ratas adultas en diferentes momentos posteriores a la inducción de un daño excitotóxico y en respuesta a una tarea asociada a la estructura.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- I. Inducir daño excitotóxico por medio de la infusión intrahipocampal de AK en ratas adultas
- II. Inducir en dos ventanas de tiempo, 10 o 30 posteriores al daño, la activación del GD a través de una de dos tareas: Memoria Aversiva Contextual o exploración espacial tanto en el grupo infundido con AK, como en el grupo Sham.

- III. Analizar la expresión proteica de NeuN como correlato de daño al GD, así como de las proteínas sinápticas y de funcionalidad SYP, PSD-95 y Arc a 10 y 30 días posteriores a la infusión de AK.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Sujetos:

Se emplearon 36 ratas adultas machos de la cepa Wistar con un peso de 250-350g, de 4 meses de edad. Las ratas se mantuvieron en cajas en condiciones estándar, con un ciclo invertido de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, disponiendo de agua y comida a libre acceso.

6.2 Cirugías Estereotáxicas:

Todos los procedimientos realizados en el presente trabajo se realizaron bajo el código de ética para trabajo de animales del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, tratando de minimizar el malestar de los sujetos.

Las cirugías estereotáxicas se realizaron con el fin de producir proceso excitotóxico en el hipocampo de ratas adultas utilizando para ello AK (monohidrato del ácido acético 2 – cardoxi-4-isopreponeli-3-pirrolidinil).

Los animales se anestesiaron con isoflurano al 2% en una mezcla de O₂ 95% y CO₂ 5% y se montaron en un aparato estereotáxico. La barra de incisivos se colocó a -3.3 mm debajo del cero horizontal. Se realizó una incisión en la piel que protege al cráneo, se descubrió el área para realizar un trepano y por medio de una jeringa Hamilton de 10 µl controlada por un inyector automático (Stoelting, Co), se infundió unilateralmente KA (Sigma Aldrich) (0.25 µl en una concentración de 0.75 nM / 1min diluido en solución amortiguadora de fosfatos 10mM con pH 7.2) (n=16) empleando las coordenadas extereotáxicas -3.6 AP ; -3.6 ML ; -2.4 DV (Paxinos y Watson, 1982), en el canal expuesto por el trépano. Una vez finalizada la infusión, la cánula de la jeringa se mantuvo en el mismo lugar por un minuto

para permitir la correcta difusión del fármaco. Al grupo control “Cánula”, se introdujo el inyector de infusión en la misma zona del GD, pero no se le administró ningún fármaco (n=16).

6.3 Grupos experimentales.

En la siguiente tabla se describen a mayor detalle los grupos empleados, así como los tratamientos y protocolos conductuales a los que se sometieron nuestros sujetos durante esta investigación.

CIRUGIAS	PROTOCOLOS CONDUCTUALES	PROTEINAS	n
10 días Sham (10d Sham Exploración)	Introducción intracerebral de cánula Exploración en caja experimental	Neun PSD-95 SYP Arc	4
10 días Sham (10d Sham CC)	Introducción intracerebral de cánula Con Condicionamiento (CC)	✓	4
10 días Ácido Kaínico (10d AK Exploración)	Infusión de Ácido Kaínico (d AK) Exploración en caja experimental	✓	4
10 días Ácido Kaínico (10d AK CC)	Infusión de Ácido Kaínico (d AK) Con Condicionamiento (CC)	✓	4
30 días Sham (30d Sham Exploración)	Introducción intracerebral de cánula Exploración en caja experimental	✓	4
30 días Sham (30d Sham CC)	Introducción intracerebral de cánula Con Condicionamiento (CC)	✓	4
30 días Ácido Kaínico (30d AK Exploración)	Infusión de Ácido Kaínico (d AK) Exploración en caja experimental	✓	3
30 días Ácido Kaínico (30d AK CC)	Infusión de Ácido Kaínico (d AK) Con Condicionamiento (CC)	✓	4
10 días Ácido Kaínico (10d AK)	Infusión de Ácido Kaínico AK (d AK) Tinción de Nissl (morfología del GD)	X	4

Tabla 1. Grupos experimentales. Descripción de los grupos empleados, así como los tratamientos a los que fueron sometidos y las proteínas que se evaluaron.

6.4 Protocolos Conductuales:

Se siguió el protocolo conductual empleado por Zepeda y colaboradores (2013). Brevemente, todos los sujetos se evaluaron durante la fase de oscuridad del ciclo invertido. El cuarto en el que se llevó acabo tanto el entrenamiento, como la evaluación se mantuvo en oscuridad. Abajo se presenta el cronograma de la metodología conductual empleada para a activación del GD y la evaluación de la memoria en las diferentes ventanas de tiempo (10 días y 30 días) posteriores a la infusión de AK o la introducción de la cánula (Fig. 4).

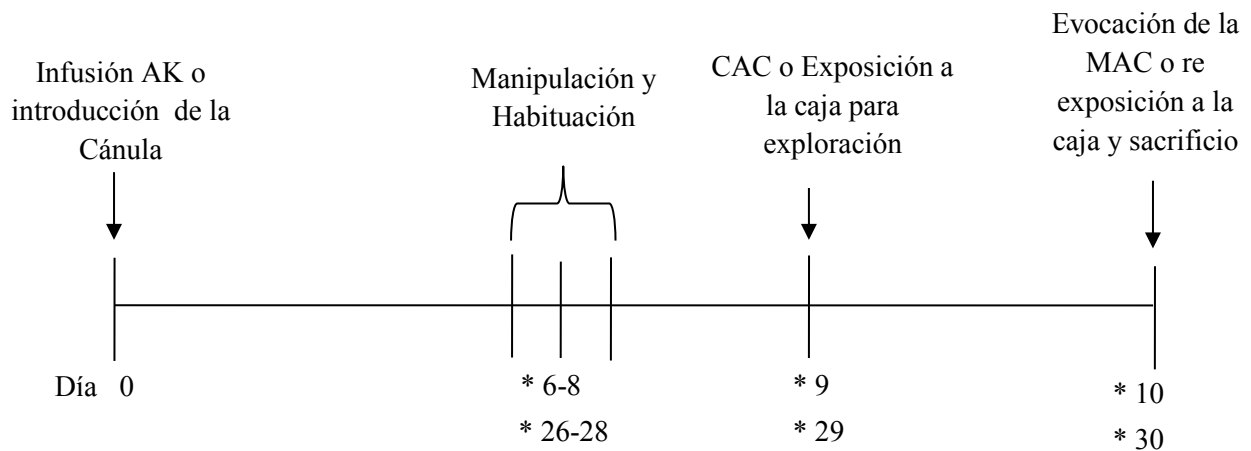


Figura 4. Diseño experimental. Línea temporal a partir del día de infusión de AK (día 0), procediendo con la aplicación de los protocolos conductuales (días 6-10/ 26-30) y finalizando con el sacrificio en las diferentes ventanas de tiempo (10 días y 30 días). (CAC: Condicionamiento aversivo contextual; MAC: Memoria Aversiva Contextual).

6.4.1 Manipulación y habituación.

Primero se llevó acabo la manipulación y habituación de los animales. La manipulación consiste en tocar a cada sujeto por 10 minutos durante 3 días consecutivos y la habituación, en permitir a cada sujeto acostumbrarse al tacto y olor del experimentador. Posterior a este proceso se inició el condicionamiento y evaluación de los sujetos en la tarea de aversión contextual o se inició a los animales en la tarea de exploración. Ambas se describen a continuación.

6.4.2 Condicionamiento Aversivo Contextual.

Este condicionamiento consiste en inducir una asociación entre un estímulo condicionado (en este caso un contexto, que es la caja de condicionamiento) y un estímulo

incondicionado (i.e. un choque eléctrico). Como consecuencia del condicionamiento, los sujetos presentan una respuesta condicionada de inmovilidad que se define como ausencia de movimiento excepto por los generados por la respiración cuando vuelven a ser expuestos al contexto; este es un indicativo del recuerdo de un ambiente es aversivo.

Para llevar a cabo el CAC, se introdujo a cada uno de los sujetos a una cámara de condicionamiento de 25 cm de largo x 25 cm de ancho x 20 cm de alto (San Diego Instruments). Las paredes y techo de la caja eran de acrílico transparente y el piso removible formado por una rejilla de 23 tubos de acero inoxidable por la que se pasa corriente eléctrica. Posee una matriz de rayos infrarrojos a nivel del piso que detecta el movimiento dentro de la cámara enviando esta información a una computadora para almacenarla y analizarla.

El condicionamiento consistió en introducir al sujeto a la caja y dejarlo explorar libremente por dos minutos (periodo “previo al 1er choque”). Transcurrido este tiempo se presentó un choque (2 segundos, 1 mA) en las patas, administrado a través del piso. Posteriormente se presentaron 4 choques en diferentes intervalos durante toda la prueba (duración de la prueba: 22 minutos). Una vez finalizado el último intervalo, se devolvió a los sujetos a su caja habitación y 24 horas posteriores al entrenamiento, se evaluó la Memoria Aversiva al Contexto (MAC).

Los sujetos fueron devueltos a su caja habitación y después de cada sesión la cámara de condicionamiento era aseada con solución limpiadora (10% Extrán y 10 % de alcohol a 96° en agua bidestilada).

6.4.3 Memoria Aversiva al Contexto.

Esta fase se empleó con la finalidad de inducir la activación de las neuronas del GD. La evaluación de la MAC se realizó 24 horas después del CA y consistió en colocar a los sujetos en la cámara donde se realizó el CAC (contexto de entrenamiento), sin que se presentara el choque eléctrico y se registró el movimiento de cada sujeto durante 5 minutos.

6.4.4 Tarea de Exploración.

La tarea de exploración conto con 2 partes, el mismo día en el que se sometió a un grupo de sujetos al entrenamiento del CAC, también se expuso a un grupo a la exposición de la caja de condicionamiento, pero sin la presentación de las sesiones de choque, A este grupo se le dejo explorar libremente en la caja el mismo que al grupo condicionado. Posteriormente de los 12 minutos de exploración libre, se les devolvió a su caja hogar. Veinticuatro horas posteriores a la exploración, se les volvió a exponer a la misma caja en las que se les dejo explorar 24hrs antes y se les dejo explorando 5 minutos en la misma caja condicionante, 30 minutos posteriores a esta exposición se sacrificaron a los sujetos y se llevó a cabo el análisis de tejido explicada a continuación.

6.5 Evaluación del contenido proteico por Western Blot.

Este procedimiento se realizó para cuantificar diferentes proteínas de interés que incluyeron PSD-95, SYP, Arc y NeuN, así como sus respectivos controles de carga α -Tubulina y β -Actina. 30 minutos posteriores a la inducción de la MAC los animales se decapitaron y se extrajo el cerebro para sumergirlo durante un minuto en 50 ml en Líquido Cefalorraquídeo Artificial Frío (ACSF) que contenía NaCl (126 mM), KCl (3.5 mM), NaH₂PO₄ (1.2 mM), MgCl₂ (1.3 mM), CaCl₂ (2 mM), Glucosa (11 mM) y NaHCO₃ (2 mM) con un pH de 7.4. Inmediatamente después se obtuvieron rebanadas del cerebro a partir de cortes coronales por vibratomo (Campden Instruments), obteniendo secciones de 400 μ m correspondientes al área de interés del hipocampo, colectándose 3 cortes de los cuales se disectó manualmente solo el GD con una navaja (Fig. 5).



Figura 5. Esquema del protocolo experimental general. Primero se presentaron los protocolos conductuales: se llevó a cabo el CAC o exposición a la exploración en la caja, 24 horas después se evaluó la evocación de la MAC o se re-expuso a la exploración en la caja y 30 minutos después se sacrificó a los animales. Se extrajo el cerebro y se colectaron cortes coronales de 400μ del área lesionada. Posteriormente se disectó el GD para el análisis por electroforesis del contenido proteico de nuestras moléculas de plasticidad de interés. (CAC: Memoria Aversiva Contextual; MAC: Memoria aversiva Contextual; GD: Giro dentado).

El tejido colectado fue homogenizado (3 pulsos de 10 segundos a 50 Hertz de amplitud, esperando 10 segundos entre cada pulso) en solución de Lysis que contenía Tris-HCl (50 mM con pH 7.5), NaCl (150 mM), Detergente Mix (2.5 mL) y, una tableta Complete (para 25-50mL) H₂O cdp (25 mL). La cuantificación de proteína de las muestras homogenizadas se determinó mediante el método de Lowry. La cantidad de proteína que se empleó fue de 50 μ g/carril para Arc; y de 25 μ g/carril para las demás proteínas. Los extractos de tejido se cargaron en geles SDS-PAGE. Las muestras se corrieron con β -mercaptoetanol al 5%, en geles de 8% (1 mm de grosor) y de 10% (0.75 mm de grosor) a 40 mA por 40 minutos. Las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de polifluoruro de vinileno (PVDF, Bio-Rad) a 250 mA por 2 horas 30 minutos (25 μ g de proteína) o por 5 horas (50 μ g de proteína). Posteriormente, para impedir el pegado inespecífico de las proteínas, las membranas se dejaron con solución de Bloqueo (SB) (PBST-BSA al 5% NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, Tween 20 al 0.1% + BSA al 5%) durante toda la noche (TN) a 4°C. La SB se decantó y se incubó el anticuerpo primario en SB TN.

Las diluciones fueron las siguientes: Anti-Arc (conejo policlonal, 1:200; Synaptic Systems), Anti-NeuN (ratón monoclonal 1:500; Milipore), Anti-Sinaptofisina (ratón monoclonal 1:500; Santa Cruz Biotechnology), Anti- PSD-95 (ratón monoclonal, 1:500; Abcam). Las membranas se lavaron 3 veces por 10 minutos con PBST y posteriormente se incubaron en anticuerpo primario para Anti- β -Actina (ratón monoclonal, 1:1000; Sigma), anti- α -Tubulina (ratón monoclonal, 1:1000; Sigma) por 2 horas a temperatura ambiente (TA). Nuevamente las membranas se lavaron 3 veces por 10 minutos, y se incubaron con sus respectivos anticuerpos secundarios: Cabra anti-ratón 1:12000; Cabra anti-conejo 1:12000 diluidos en SB por 2 horas a TA, prosiguiendo con 3 lavados por 10 minutos. Las proteínas se visualizaron empleando 3,3'diaminobencidina (DAB) (Tris pH 7.2 195.25 mg/12.5 ml H₂O; DAB 7.5 μ g; H₂O₂ 15 μ l) y posteriormente se llevó a cabo el análisis de densitometría de las bandas mediante el uso del programa Image J. Para normalizar los datos obtenidos de las densitometrías, los valores obtenidos de cada proteína se dividieron entre los valores de sus respectivos controles de carga (que fueron α -Tubulina o β -Actina) y ese valor se graficó como Densidad Óptica (D.O) en Unidades Arbitrarias.

6.6 Tinción de Nissl

Este procedimiento se realizó solo en un grupo independiente con el fin de evaluar el impacto de la infusión hipocampal de AK sobre la integridad anatómica del GD. Esta tinción consiste en teñir el retículo endoplasmático rugoso de las células, lo que nos permite identificar con facilidad cuerpos celulares en una región. Este control se llevó a cabo en cortes de sujetos perfundidos a los 10 días posterior a la infusión de AK (n=4). La perfusión consistió en inyectar a los sujetos con 1 mL de pentobarbital sódico y se les perfundió intracardialmente con 300 mL de salina (NaCl) al 0.9% y 300 mL de Paraformaldehído (PFA) al 0.4%. Los cerebros fueron extraídos y se mantuvieron en PFA y posteriormente se mantuvieron en Buffer de Fosfatos (PB 0.1M) más sacarosa en diferentes concentraciones (primero a 15% de sacarosa por 24 horas y posteriormente al 30% por 48 horas) para después proceder a cortarlos. Se obtuvieron cortes coronales con un grosor de 40 μ m por medio de un criostato (Leica) a una temperatura de -20°. Una vez obtenidos, los cortes se montaron en portaobjetos gelatinizados, se sumergieron por 2 minutos en agua bidestilada para hidratarlos y posteriormente se sumergieron en etanol al 70%, 95% y 100%

respectivamente durante 2 minutos cada uno con el fin de deslipidizar el tejido. Posteriormente, se les volvió a sumergir en etanol al 95% y 70% y en agua bidestilada por 30 segundos con el fin de rehidratar el tejido. Se sumergieron por alrededor de 4 minutos en violeta de cresilo (1.0%), posteriormente se les volvió a sumergir por 30 segundos en los porcentajes ascendentes de etanol ya mencionados para deshidratar y después lavar en Xilol por 5 minutos; procediendo a cubrir con medio de montaje Permout (Daigger) y cubreobjetos.

6.7 Análisis estadístico

Los resultados representan la media \pm S.E.M. Para analizar el desempeño de los sujetos experimentales en la tarea de aprendizaje de CAC, en la evocación de la MAC y en la tarea de exploración, se llevó a cabo un ANOVA Factorial y la prueba *post hoc* Bonferroni ($p < 0.05$). Para el análisis de las bandas obtenidas mediante Western se llevó a cabo una prueba t de Student no pareada, $p < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo. Los valores de la densidad óptica de las proteínas se normalizaron con el valor de sus respectivos controles de carga (α -Tubulina/ β -Actina). Para los gráficos y análisis estadístico, se empleó el software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE.UU).

7. RESULTADOS

7.1 Pruebas conductuales

Para la tarea CAC, se evaluó la movilidad en línea base (tiempo previo al primer choque en el contexto) con el objetivo de establecer el porcentaje de movimiento de cada sujeto en el contexto en ausencia del estímulo aversivo. El ANOVA no mostró diferencias estadísticamente significativas ($F_{(7,23)} = 0.8951$, $p = 0.5265$) entre grupos durante este periodo, mostrando una tendencia similar de movilidad en todos los grupos. (Fig. 6A).

En la fase de entrenamiento (posterior al primer choque) se pudo apreciar una curva de aprendizaje para los grupos condicionados, no así para los grupos de “exploración”. El ANOVA mostró diferencias significativas entre los grupos “exploración” y grupos los

condicionados a los 10 días (CC). El análisis *post hoc* arrojó diferencias estadísticamente significativas entre los grupos 10d sham con la tarea de Exploración vs. el grupo 10d Sham CC en las presentaciones del 3° ($p < 0.05$ *), 4° ($p < 0.001$ ***) y 5° choque ($p < 0.01$ **); de la misma forma la comparación entre el grupo 10d AK Exploración y 10d AK CC mostró diferencias significativas en las presentaciones en el 4° ($p < 0.001$ ***) y 5° choque ($p < 0.01$ **) (Fig.6 B). La comparación entre los grupos 30d Sham Exploración y 30d Sham CC mostró las mismas diferencias significativas que los grupos 10d Sham Exploración vs. 10d Sham CC en las mismas presentaciones del choque. La comparación entre el grupo 30d AK Exploración y 30d AK CC mostró diferencias significativas desde la 2° presentación del choque ($p = 0.05$ *) hasta el 3°, 4° ($p = 0.001$ ***) y 5° ($p = 0.01$ **) (Fig. 6 C). Estos resultados mostraron que de manera independiente a la infusión de AK, todos los sujetos condicionados desplegaron una conducta de aprendizaje al estímulo aversivo, mientras que, como se esperaba, el grupo “exploración” no lo hizo.

24 horas posteriores al entrenamiento se evaluó la evocación de la Memoria Aversiva Contextual (MAC), tarea dependiente de GD. El ANOVA factorial mostró resultados significativos entre los grupos 10d AK Exploración y 10d AK CC, así como entre los grupos 30d AK Exploración y 30d AK CC ($p < 0.05$ *). De la misma forma, se observaron diferencias significativas entre los grupos 10d Sham Exploración vs. 10d Sham CC, y entre los grupos 30d Sham Exploración vs. 30d Sham CC ($p < 0.05$ *), mostrando un aumento significativo en el porcentaje de inmovilidad en todos los sujetos condicionados al compararlo con los grupos a expuestos a la tarea de exploración.

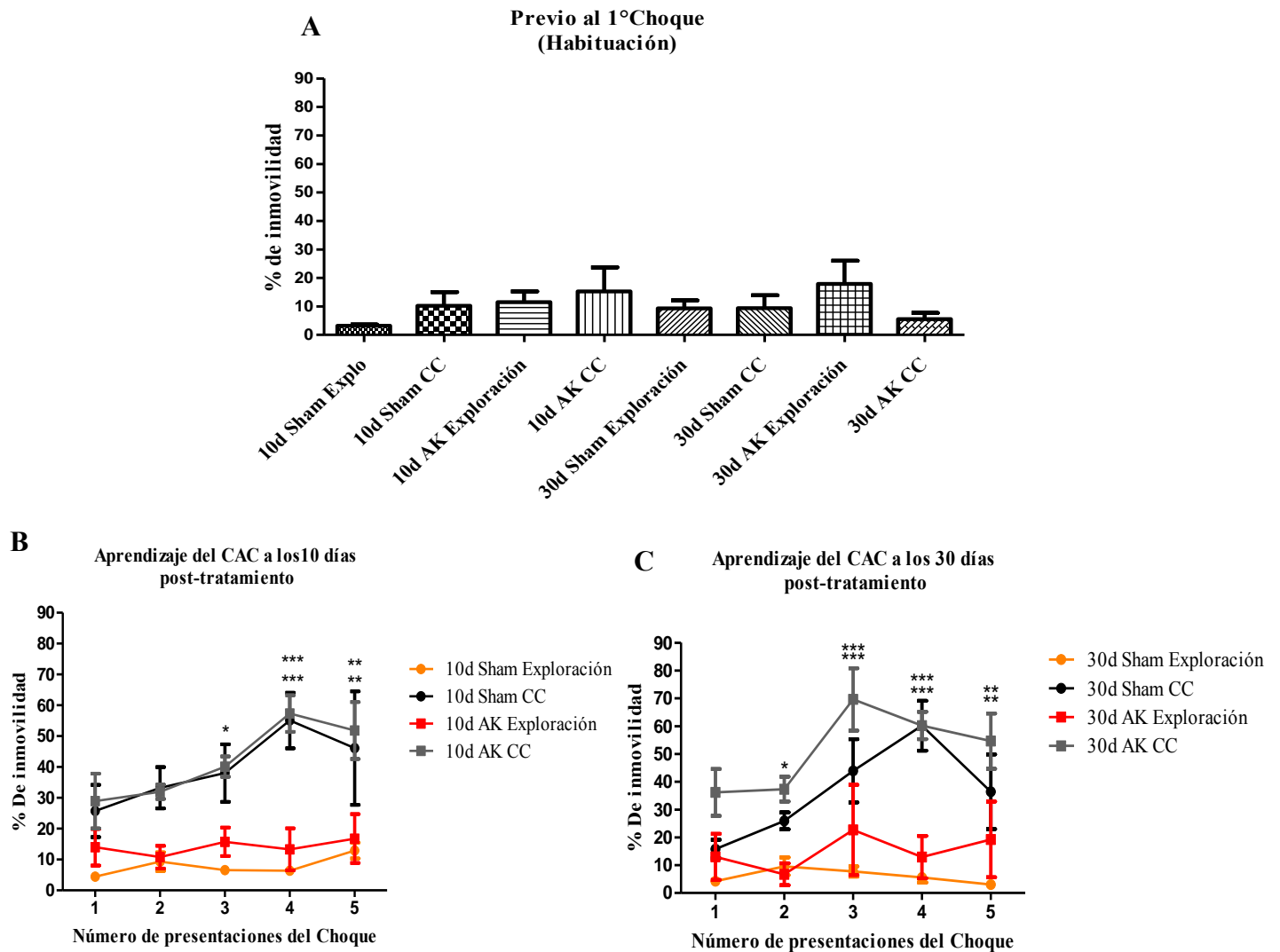


Figura 6. Condicionamiento Aversivo Contextual (CAC) (A) Porcentajes de inmovilidad previa a la presentación del primer choque en el contexto. Todos los grupos presentan un porcentaje bajo de inmovilidad previo al entrenamiento ($F(7,23)=0.8951, p=0.5265$). (B) Se presentan las curvas de aprendizaje de los diferentes grupos 10 días posteriores a la infusión de AK o introducción de cánula entrenados a la tarea de CAC o a una tarea de exploración. Todos los grupos a los que se les instruyó en la prueba de condicionamiento mostraron un mayor porcentaje de inmovilidad a lo largo de la sesión en comparación con los grupos no condicionados cuyo porcentaje de inmovilidad fue bajo. El *post hoc* arrojó diferencias significativas entre los grupos 10d Sham Exploración ($n=4$) vs. 10d Sham CC ($n=4$) en la presentación del 3° ($p<0.05$ *), 4° ($p<0.001$ ***) y 5° choque ($p<0.01$ **). De igual forma, los grupos 10d AK Exploración ($n=4$) vs. 10d AK CC ($n=4$) mostraron diferencias significativas en la presentación del 4° ($p<0.001$ ***) y 5° choque ($p<0.01$ **). (C) Presentación de las curvas de aprendizaje de los diferentes grupos a 30 días posteriores a la infusión de AK o introducción de cánula entrenados a la tarea de CAC o a una tarea de exploración. Los datos observados mostraron diferencias significativas entre los grupos 30d Sham Exploración ($n=4$) vs. 30d Sham CC ($n=4$) en la presentación del 4° ($p<0.001$ ***) y 5° choque ($p<0.01$ **). De la misma forma en los grupos 30d AK Exploración ($n=3$) vs. 30d Ak CC ($n=4$) se observaron datos significativo desde la 2° presentación del choque ($p=0.05$ *), seguido por la 3°, 4° ($p=0.001$ ***) y 5° choque ($p=0.01$ **). Los resultados son representados con la media \pm S.E.M

CAC: Condicionamiento Aversivo Contextual; MAC: Memoria Aversiva Contextual; CC: Con condicionamiento; 10d AK/ 30d AK: 10 o 30 días post-infusión AK; 10d Sham / 30d Sham: 10 o 30 días introducción de cánula. ($p<0.05$ *), ($p<0.01$ **), ($p<0.001$ ***)).

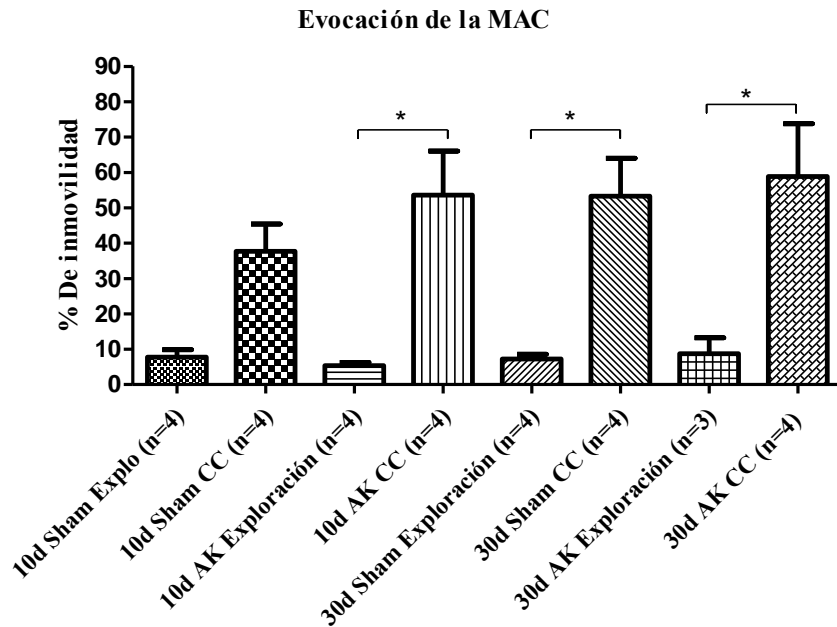


Figura 7. Evocación de Memoria Aversiva Contextual (MAC). Evaluación de la Memoria Aversiva Contextual (MAC). La evaluación de esta tarea demostró que todos los grupos condicionados recordaron el contexto como aversivo, sin importar el tratamiento (infusión o introducción de la cánula) o la temporalidad post infusión (10 o 30 días). Todos los sujetos condicionados desplegaron mayor porcentaje de inmovilidad comparándolos con los sujetos sometidos a la tarea de exploración en ambas ventanas de tiempo ($p < 0.05^*$). Los resultados son representados con la media \pm S.E.M.

CAC: Condicionamiento Aversivo Contextual; MAC: Memoria Aversiva Contextual; CC: Con condicionamiento; 10d AK/ 30d AK: 10 o 30 días infusión AK; 10d Sham/ 30d Sham: 10 o 30 días introducción de cánula ($p < 0.05^*$).

Los resultados previos muestran que los grupos infundidos con AK no modificaron la respuesta ante una tarea propia del GD, pues si recordaron el contexto aversivo. Por ello, quisimos evaluar el la integridad del hipocampo y del GD post-tratamiento (infusión de AK e introducción de la cánula) y así evaluar el alcance del AK. Realizamos un análisis histológico de Nissl con el objetivo de observar la morfología de la formación hipocampal tras la infusión excitotóxica del AK, y de manera más puntual, quisimos evaluar la integridad del GD mediante la evaluación del contenido proteico del marcador nuclear de neuronas maduras NeuN como correlato de integridad celular de la capa granular del GD en las diferentes ventanas de tiempo (10 y 30 días) posteriores a la infusión intrahipocampal de AK.

7.2 Alcance del AK en la formación hipocampal y en el GD

7.2.1 Expresión Protéica de NeuN en GD

Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas entre las densidades ópticas de la banda de NeuN de los grupos a los que se les condicionó y a los expuestos a una tarea de exploración, de la misma forma, tampoco se observaron diferencias entre el grupo 10 días y 30 días Sham, ni entre los grupos 10 días y 30 días infundidos con AK. Debido a que el objetivo del análisis de NeuN en el GD fue ver el alcance del AK, se decidió agrupar los grupos sin importar tarea o temporalidad, evaluando solo la introducción de la cánula (grupo control) y la infusión de AK. Los resultados observados no mostraron cambios significativos entre los grupos Sham y los grupos infundidos con AK. Estos resultados sugieren que la infusión excitotóxica del AK no fue suficiente para generar una pérdida significativa de neuronas maduras en el GD, pues se observan los mismos niveles de proteína que en los sujetos con Cánula.

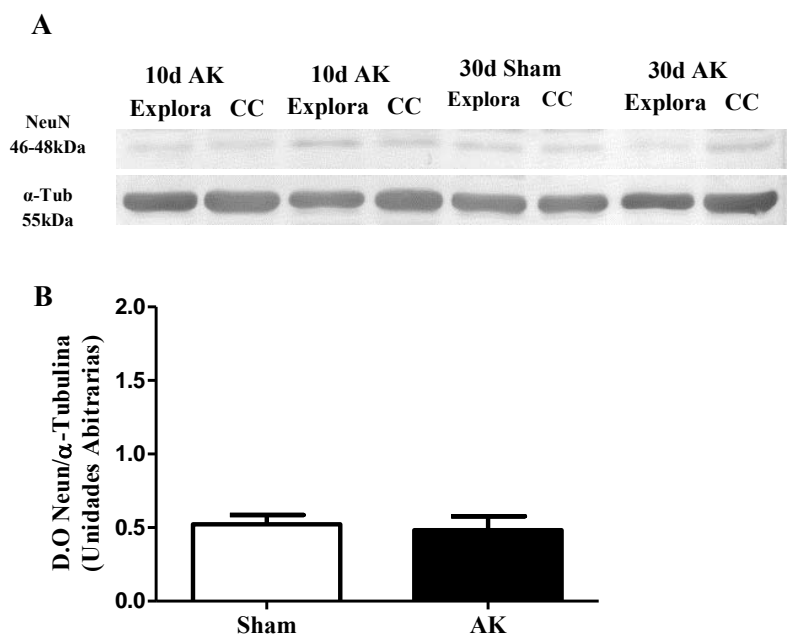


Figura 8. Expresión de NeuN en GD posterior a la infusión de AK intrahipocampal comparándola con el grupo al que se introdujo solo la Sham. (A) Western blot representativo de NeuN ($n=4$ por condición, excepto la condición 30dAK SC; $n=3$) con su respectivo control de carga α -Tubulina. No se observaron diferencias entre tareas, ni entre las dos ventanas de tiempo (10 y 30 días) por lo que se agruparon solo acorde a la introducción de la cánula o a la infusión de AK. (B) La comparación de la agrupación de los sujetos a los que se les introdujo la cánula y a los que se les infundió AK no reflejaron ($t=0.3609$, $df=29$, $p=0.7208$). Los datos presentados se normalizaron con respecto a su control de carga y se muestran las densitometrías de la densidad óptica en unidades arbitrarias de NeuN normalizado. Los resultados son representados con la media \pm S.E.M.

Explora. : Tarea de Exploración; CC: Con condicionamiento; 10d AK/ 30d AK: 10 o 30 días infusión AK; 10d Sham / 30d Sham: 10 o 30 días introducción de cánula.

7.2.2 Tinción de Nissl del Hipocampo

Cortes de sujetos independientes, mostraron que en un 75% de los animales del grupo 10d AK, el GD se veía desestructurado observándose también daño al hilus y en CA3. Mientras que los cortes de sujetos independientes sacrificados 30d AK muestran que en el 75% de los sujetos, el GD presenta un área menor de daño, aun cuando el hilus y CA3 continúan mostrando daño (Fig. 9 B y C).

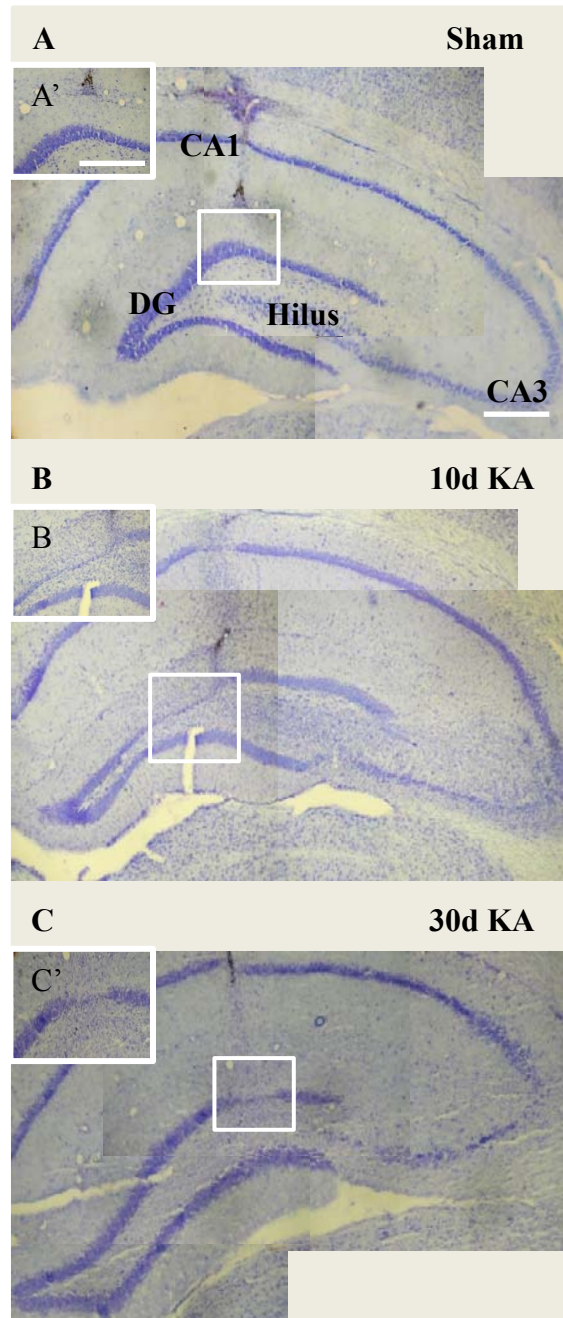


Figura 9. Tinción de Nissl de la región del hipocampo. Imágenes representativas de cortes coronales de hipocampo ipsilateral a la infusión de AK procesados para tinción de Nissl correspondientes a 3 sujetos independientes. Reconstrucción de imágenes capturadas a 10X A) Sham, B) 10d AK, C) 30d AK . Barra de calibración: 400µm. Magnificación a 20X del área afectada por el AK en GD (A'-C') enmarcados por el cuadro blanco. Barra de calibración: 200µm.

7.3 Contenido proteico mediante Western blot de moléculas reporteras de plasticidad

El análisis de estos marcadores se llevó a cabo por medio de la cuantificación del contenido total de proteína realizado por medio de la técnica de Western blot. El análisis se realizó comparando los grupos tomando en cuenta las siguientes condiciones:

1. Conducta: en esta condición se evaluó si se presentaban cambios dependientes de la demanda cognitiva en la expresión de las proteínas de interés en ambas ventanas de tiempo.
2. Tiempo: en esta condición se evaluó la modificación proteica a través de nuestras dos ventanas de tiempo (10 y 30 días).
3. Infusión: en esta condición se evaluó si la infusión misma de AK provocó alguna modificación en la expresión proteica con respecto a los sujetos controles que no recibieron la infusión de AK.

7.3.1 Expresión Proteica de Sinaptofisina (SYP)

Una de las proteínas que se evaluó fue la glicoproteína asociada a la membrana de vesículas sinápticas Sinaptofisina (SYP). En este trabajo se evaluó con el fin de analizar si los niveles de la proteína variaban ante la condición excitotóxica, y ante la evocación de la memoria aversiva contextual a lo largo del tiempo como un correlato de sinaptogénesis.

Se realizaron comparaciones mediante la prueba t-Student. El análisis no mostró diferencias estadísticamente significativas en la expresión proteica de SYP con respecto a la evocación de la MAC entre los grupos exploración y los grupos condicionados. Esto resultó cierto tanto para los grupos lesionados, como para los sham. (Fig.10 A-E). Este resultado indica que el contenido de SYP no se modifica de manera diferencial en respuesta a la evocación de una memoria aversiva contextual.

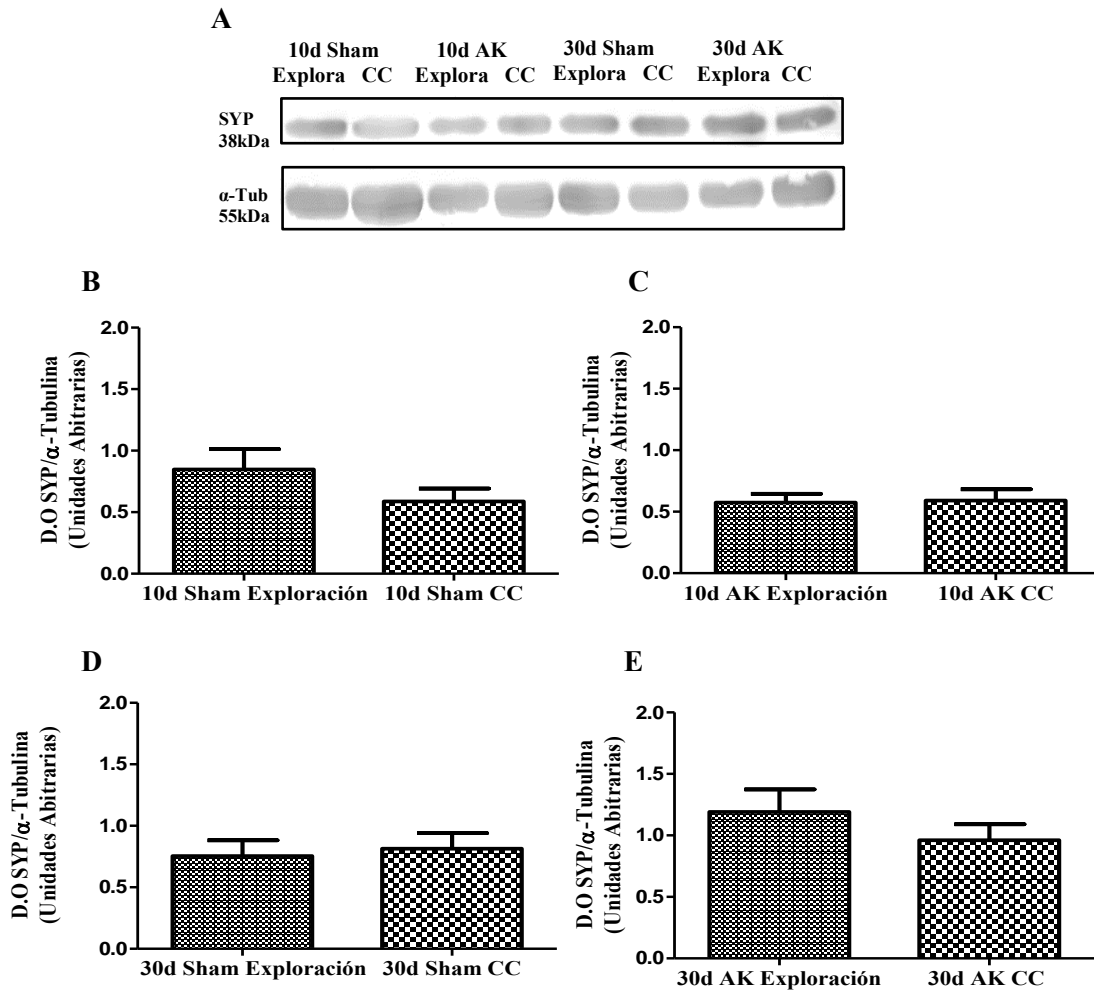


Figura 10. Expresión de SYP posterior a la evocación de la Memoria Aversiva Contextual. Comparación de la expresión de SYP entre los grupos a los que se les entrenó en una tarea de memoria aversiva contextual y a una tarea de exploración. A) Imagen representativa de un Western blot de SYP con su respectivo control de carga α -Tubulina. B) La comparación entre el grupo 10d Sham Exploración y 10d Sham CC, no reflejó diferencias significativas ($F(6) = 1.328, p = 0.2324$). C) La comparación entre el grupo 10d AK Exploración y 10d AK CC, no mostró diferencias significativas ($F(6) = 0.154, p = 0.8824$). D) La comparación entre el grupo 30d Sham Exploración y 30d Sham CC, no reflejó diferencias significativas ($F(6) = 0.330, p = 0.7527$). E) La comparación de los grupos 30d AK Exploración y 30d AK CC, no mostró diferencias significativas ($F(6) = 1.030, p = 0.3427$). Los datos se normalizaron con respecto a su control de carga α -Tubulina y se muestran las densitometrías de la densidad óptica de las unidades arbitrarias de SYP normalizado ($n = 4$ en cada grupo). Los resultados son representados con la media \pm S.E.M.

Explora: Tarea de Exploración; **CC:** Con condicionamiento; **10d AK/ 30d AK:** 10 o 30 días infusión AK; **10d Sham / 30d Sham:** 10 o 30 días introducción de cánula.

El análisis comparativo de la expresión de SYP en el GD a lo largo del tiempo (10 días y 30 días posteriores a la infusión de AK o introducción de la cánula) mostró un aumento estadísticamente significativo en el grupo 30d AK en comparación con el 10 AK en la

condición de exploración ($F(6) = 3.140, p = 0.02^*$) (Fig.11 D). Esta misma tendencia se observó entre los grupos 10d AK y 30d AK CC ($F(6) = 2.318, p = 0.0596$) (Fig.11 E), pero no entre los grupos a los que solo se les introdujo cánula (Fig.11 B, C)

Al analizar si los niveles de SYP se modificaban entre el grupo lesionado y control en la condición de exploración se observó que no había diferencias significativas entre los niveles del grupo 10d AK Exploración y 10d Sham Exploración ($F(6) = 1.518, p = 0.1799$) (Fig. 12 B), ni entre los grupos 30d Sham Exploración vs. 30d AK Exploración, ($F(6) = 1.960, p = 0.09$) (Fig. 12 D). En apoyo a la observación anterior, la ausencia de diferencias entre los grupos sacrificados a un mismo tiempo con y sin infusión de AK, sugiere que las modificaciones en los niveles de SYP dependen del tiempo en conjunto con el daño.

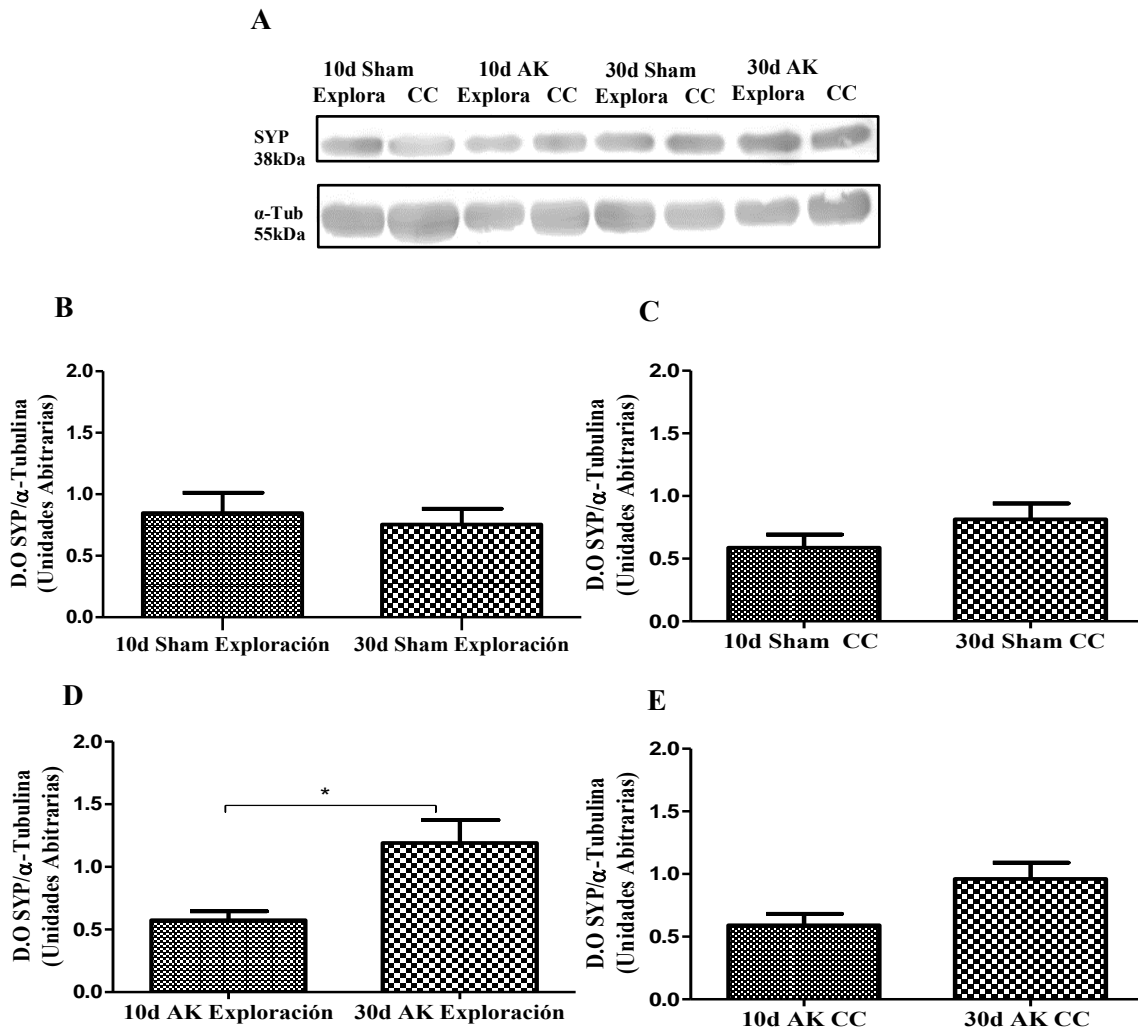


Figura 11. Expresión de SYP a través de las diferentes ventanas de tiempo (10 días y 30 días). Comparación de la expresión de SYP evaluada en dos ventanas de recuperación del GD a los 10 y 30 días post-infusión o cánula. A) Imagen representativa de un Western blot de SYP con su respectivo control de carga α -Tubulina. B) La comparación entre el grupo 10d Sham y 30d Sham en la condición de exploración, no mostró diferencias significativas entre grupos ($F(6) = 0.4445, p = 0.6723$). C) La comparación entre el grupo 10d Sham y 30d Sham CC, no reflejó diferencias significativas entre grupos ($F(6) = 1.37, p = 0.0905$). D) La comparación entre el grupo 10d AK y 30d AK en la condición de Exploración mostraron diferencias estadísticamente significativas ($F(6) = 3.140, p = 0.02^*$). E) La comparación entre el grupo 10d AK y 30d AK CC, no mostró diferencias estadísticamente significativas, sin embargo, se observa una tendencia a incrementar la expresión de SYP en el grupo 30d AK CC ($F(6) = 2.318, p = 0.0596$). Los datos se normalizaron con respecto a su control de carga α -Tubulina y se muestran las densitometrías de la densidad óptica de las unidades arbitrarias de SYP normalizado ($n = 4$ en cada grupo). Los resultados son representados con la media \pm S.E.M.

Explora: Tarea de Exploración; **CC:** Con condicionamiento; **10d AK/ 30d AK:** 10 o 30 días infusión AK; **10d Sham / 30d Sham:** 10 o 30 días introducción de cánula, ($p = 0.02^*$).

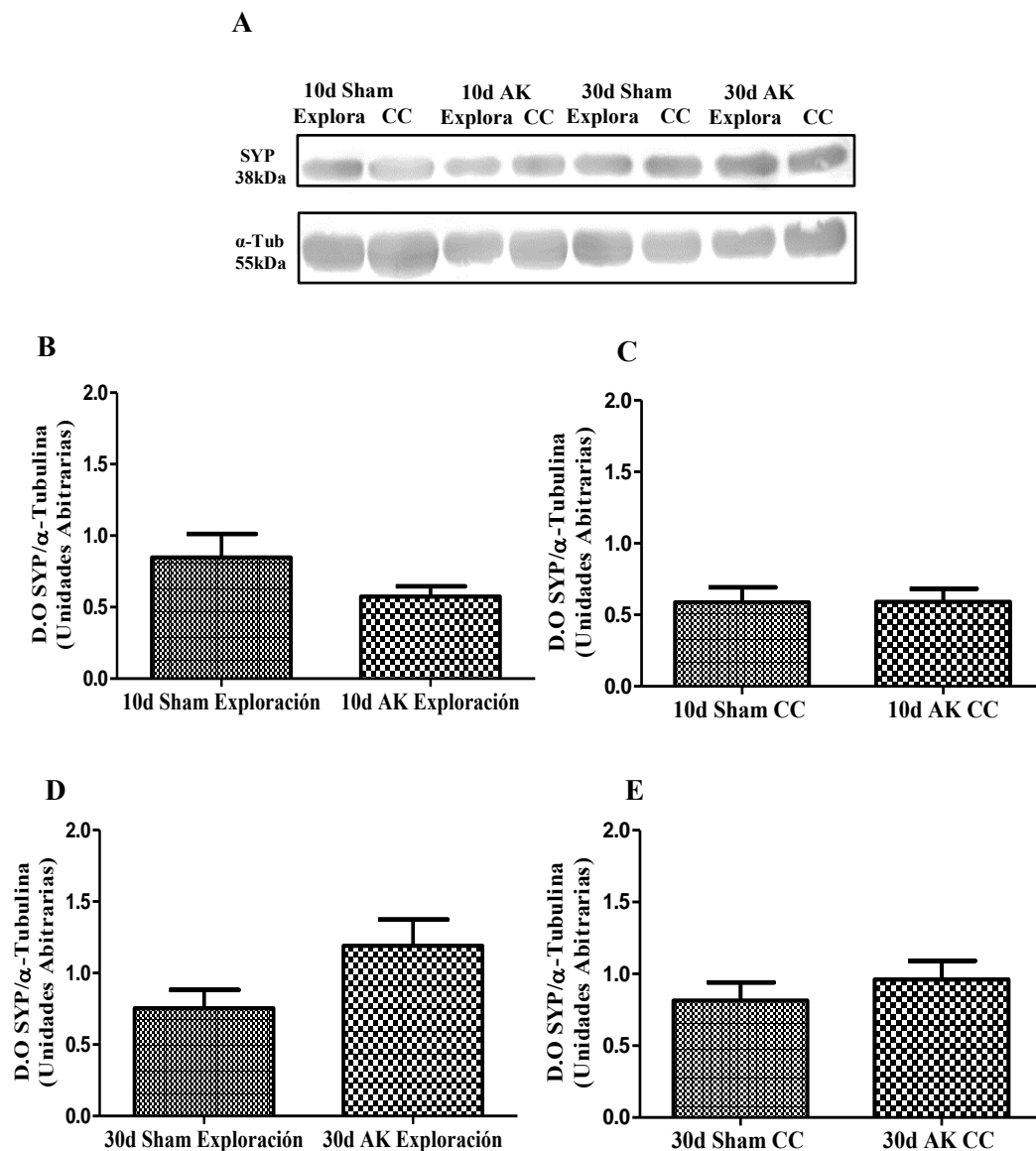


Figura 12. Expresión de SYP dependiente de la infusión de AK. A) Western blot representativo de SYP con su respectivo control de carga α -Tubulina. B) Comparación entre grupos 10d Sham vs. 10d AK en la condición de exploración. No se observaron diferencias significativas entre grupos ($F(6) = 1.518, p = 0.1799$). C) La comparación entre el grupo 10d Sham y 10d AK CC no reflejó diferencias significativas entre grupos ($F(6) = 0.0265, p = 0.9797$). D) La comparación entre el grupo 30d Sham y 30d AK en la condición de exploración no mostró diferencias estadísticamente significativas ($F(6) = 1.960, p = 0.09$). E) La comparación entre el grupo 30d Sham y 30d AK CC no reflejó resultados estadísticamente significativos ($F(6) = 0.803, p = 0.4526$). Los datos se normalizaron con respecto a su control de carga α -Tubulina y se muestran los datos del análisis de densidad óptica en unidades arbitrarias ($n = 4$ en cada grupo). Los resultados son representados con la media \pm S.E.M.

Explora: Tarea de Exploración; **CC:** Con condicionamiento; **10d AK / 30dAK:** 10 o 30 días infusión AK; **10d Sham / 30d Sham:** 10 o 30 días introducción de cánula.

7.3.2 Expresión proteica de la Densidad Postsináptica 95 (PSD-95)

Otra proteína sináptica que se evaluó en esta investigación fue la proteína PSD-95, como un correlato de la función sináptica. Siguiendo con las mismas comparaciones por condición, los resultados obtenidos muestran que no hubo diferencias significativas entre los grupos que evocaron una MAC y los que se sometieron a una tarea de exploración (Fig. 13 A-E). Tampoco se encontraron diferencias significativas en la expresión de PSD-95 entre las ventanas de tiempo analizadas (Fig. 14 A-E) ni se observaron modificaciones en los niveles de PSD-95 al evaluar su expresión post tratamiento (Fig. 15 A-E).

Estos datos sugieren que las modificaciones de PSD-95 no son lo suficientemente robustas ante estas condiciones, y que esta no se expresa de manera diferencial ante la evocación de una memoria aversiva contextual comparándola con una tarea de exploración, ni tampoco se observan modificaciones diferenciales en el GD entre sujetos infundidos con AK, ni a lo largo de las ventanas temporales (10 o 30 días).

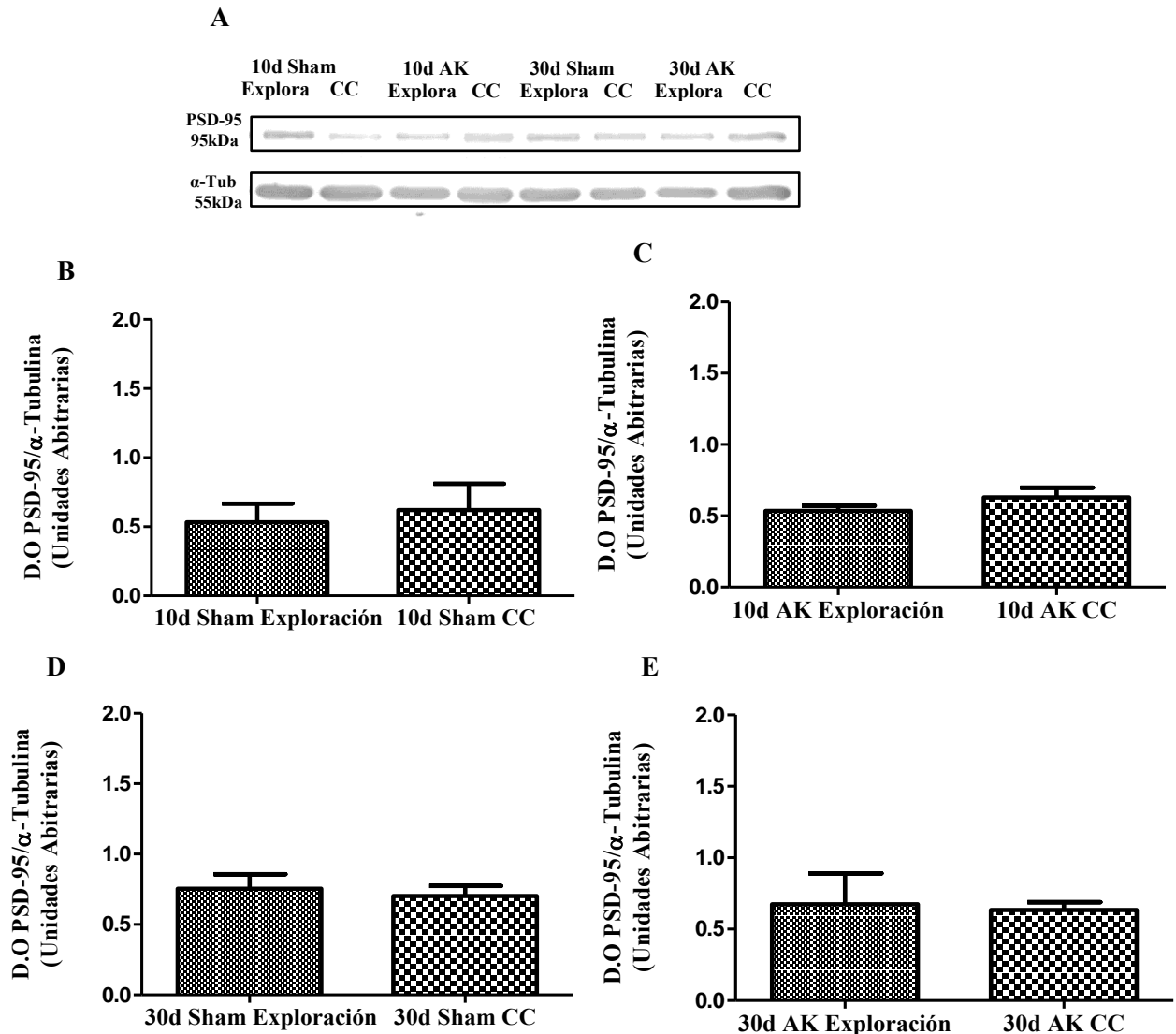


Figura 13. Expresión de PSD-95 posterior a la evocación de la Memoria Aversiva Contextual. Comparación entre de la expresión de PSD-95 entre los grupos a los que se les entreno a una tarea de memoria aversiva contextual y a una tarea de exploración. (A) Imagen representativa de un Western blot de PSD-95 con su respectivo control de carga α -Tubulina. (B) La comparación entre el grupo 10d Sham vs. 10d Sham Exploración no reflejó diferencias significativas ($F(6) = 3.783, p = 0.7183$) (C) Se compararon el grupo 10d AK Exploración y 10d AK CC, sin encontrar diferencias significativas ($F(6) = 1.21, p = 0.2714$). (D) La comparación entre el grupo 30d Sham Exploración vs. 30d Sham CC, el cual no reflejo diferencias significativas ($F(6) = 0.3040, p = 0.7009$). (E) Se compararon el grupo 30d AK Exploración y 30dAK CC, sin encontrar diferencias significativas ($F(5) = 0.008, p = 0.8445$). Los datos se normalizaron con respecto a su control de carga α -Tubulina y se muestran las densitometrías de la densidad óptica de las unidades arbitrarias de PSD-95 normalizado. ($n = 4$ por grupo, excepto grupo 30d AK Exploración; $n = 3$). Los resultados son representados con la media \pm S.E.M.

Explora: Tarea de Exploración; **CC:** Con condicionamiento; **10d AK/ 30d AK:** 10 o 30 días infusión AK; **10d Sham/ 30d Sham:** 10 o 30 días introducción de cánula.

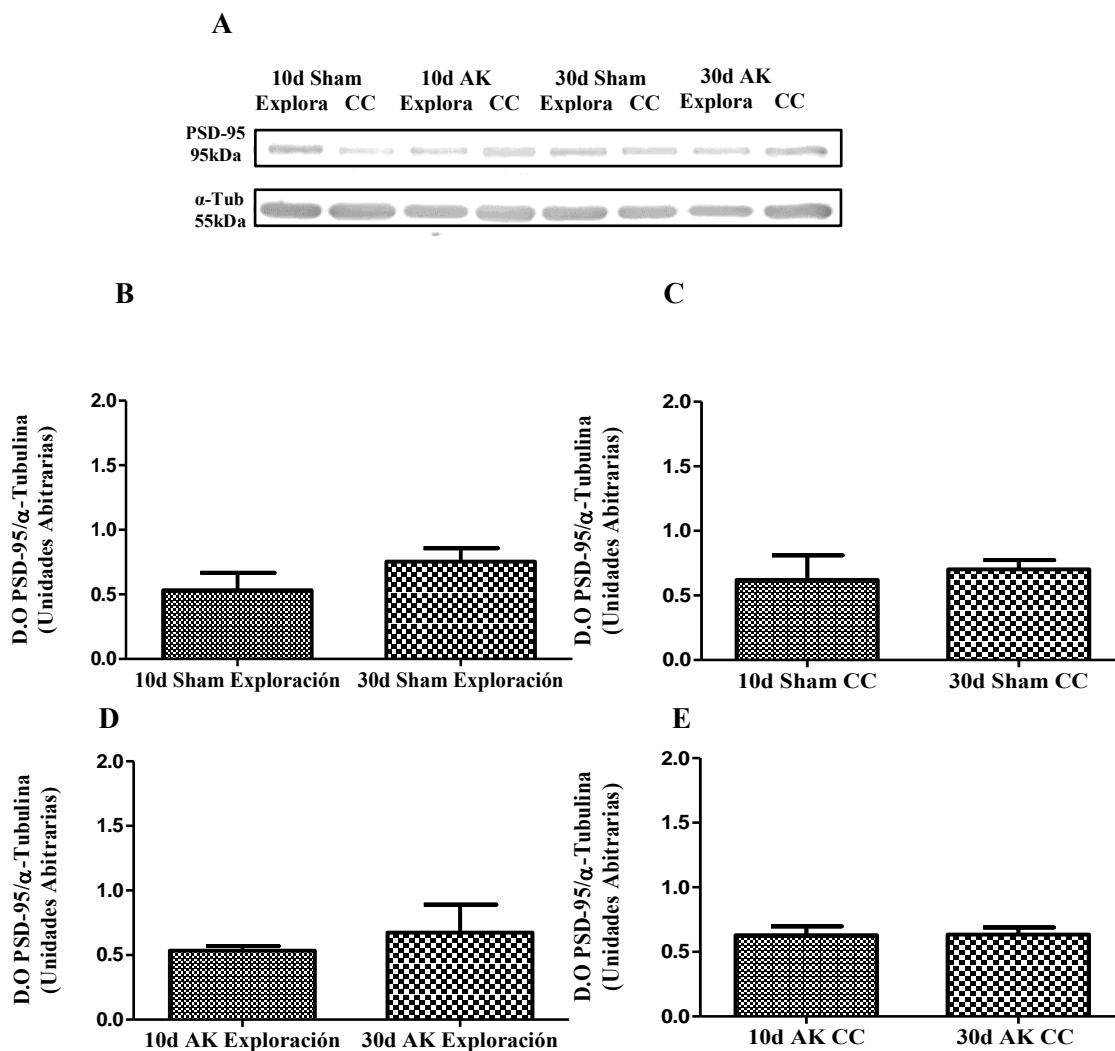


Figura 14. Expresión de PSD-95 a través de las diferentes ventanas de tiempo (10días y 30días). Comparación de la expresión de PSD-95 evaluada en dos ventanas de recuperación del GD a los 10 y 30 días post-infusión o cánula. A) Imagen representativa de un Western blot de PSD-95 con su respectivo control de carga α -Tubulina. A) Imagen de Western blot representativo de PSD-95 con su respectivo control de carga α -Tubulina. B) La comparación de la expresión de PSD-95 entre el grupo 10d Sham y 30d Sham Exploración no mostró diferencias significativas entre grupos ($F(6) = 1.290, p = 0.2444$). C) La comparación entre el grupo 10d Sham y 30d Sham CC no mostró diferencias significativas en la expresión de PSD-95 entre estos grupos ($F(6) = 0.403, p = 0.7009$). D) La comparación entre el grupo 10d AK y 30d AK Exploración no mostró diferencias estadísticamente significativas ($F(5) = 0.7520, p = 0.4859$). E) La comparación entre el grupo 10d AK y 30d AK CC no mostró resultados estadísticamente significativos en la expresión de PSD-95 en estos grupos ($F(6) = 0.063, p = 0.9511$). Los datos se normalizaron con respecto a su control de carga α -Tubulina y se muestran las densitometrías de la densidad óptica de las unidades arbitrarias de PSD-95 normalizado. (n=4 por grupo, excepto grupo 30d AK Exploración; n=3) Los resultados son representados con la media \pm S.E.M.

Explora: Tarea de Exploración; **CC:** Con condicionamiento; **10d AK/ 30d AK:** 10 o 30 días infusión AK; **10d Sham / 30d Sham:** 10 o 30 días introducción de cánula

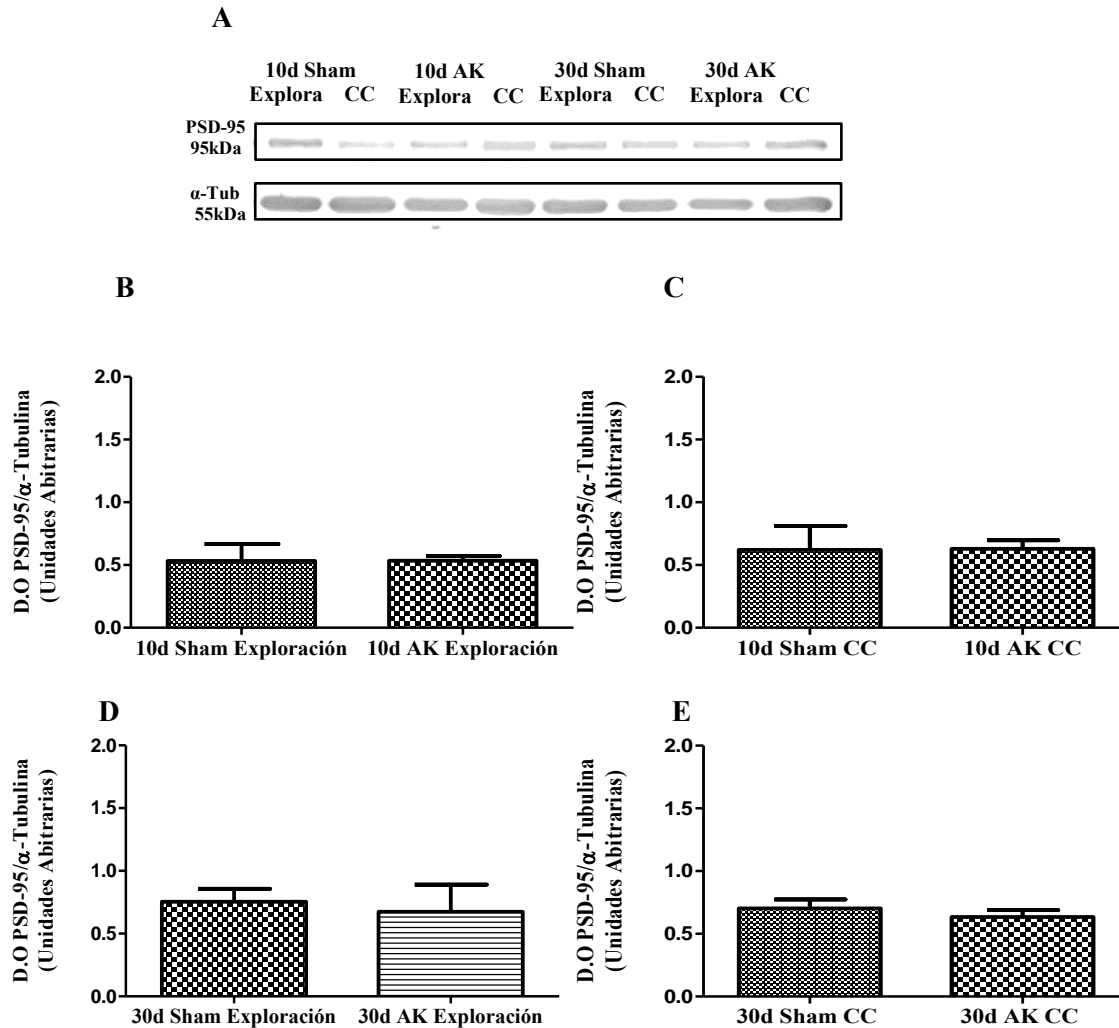


Figura 15. Expresión de PSD-95 en GD posterior a la infusión de AK intrahipocampo comparándola con el grupo al que se introdujo solo la Cánula. Comparación de la expresión de PSD-95 post- tratamiento. A) Imagen Representativa de un Western blot de PSD-95 con su respectivo control de carga α -Tubulina. A) Western blot representativo de PSD-95 con su respectivo control de carga α -Tubulina. B) La comparación entre el grupo 10d Sham y 10d AK Exploración no mostró diferencias significativas entre estos grupos ($F(6) = 0.008, p = 0.9935$). C) La comparación entre el grupo 10d Sham y 10d AK CC no reflejó diferencias significativas entre estos grupo ($F(6) = 0.0404, p = 0.9690$). D) La comparación entre el grupo 30d Sham y 30d AK Exploración no mostró diferencias estadísticamente significativas en la expresión de PSD-95 ($F(5) = 0.3606, p = 0.7331$). E) La comparación entre el grupo 30d Sham y 30d AK CC no mostró resultados estadísticamente significativos ($F(6) = 0.7592, P = 0.4765$). Los datos se normalizaron con respecto a su control de carga α -Tubulina y se muestran las densitometrías de las densidades ópticas en unidades arbitrarias de PSD-95 normalizado. ($n = 4$ por grupo, excepto grupo 30d AK Exploración; $n = 3$) Los resultados son representados con la media \pm S.E.M.

Explora: Tarea de Exploración; **CC:** Con condicionamiento; **10d AK/ 30d AK:** 10 o 30 días infusión AK; **10d Sham / 30d Sham:** 10 o 30 días introducción de cánula

7.3.3 Expresión Protéica del IEG asociado a la actividad regulada por el citoesqueleto (Arc)

Por último se evaluó la expresión de una proteína de el gen de expresión temprana o IEG Arc, que fue de particular interés para nosotros, pues esta proteína como se mencionó con anterioridad es una molécula cuya expresión es dependiente de la activación sináptica (Lyfrord *et al.*, 1995), y se le ha postulado que un papel importante tanto para la remodelación de espinas dendritas, como para la expresión de plasticidad sináptica y funcional (Bramham *et al.*, 2008).

Al analizar los niveles de Arc posterior a posterior a la evocación de la MAC, la prueba t de Student no mostró diferencias estadísticamente significativas al comparar la expresión de Arc entre el grupo 10d Sham Exploración y el grupo 10d Sham CC, ni al comparar los grupos 30d Sham Exploración y 30d Sham CC (Fig.16 B, D). En los sujetos controles (Sham) la evocación y la exploración de un contexto determinado no produjeron una respuesta diferencial en los niveles de Arc entre tareas espaciales. Tampoco se observaron diferencias significativas entre tareas en ni a 10 ni a 30d posteriores a la infusión de AK (Fig. 16 C, E). De forma interesante se puede observar una tendencia a disminuir los niveles de Arc en el grupo 30d AK CC comparándolo con el grupo 30d AK Exploración, sin embargo esta disminución no fue significativa (Fig. 16 E).

Lo anterior permite sugerir que la expresión de Arc posterior a la evocación de una MAC no es diferente a la ocurrida posterior a una memoria de exploración espacial.

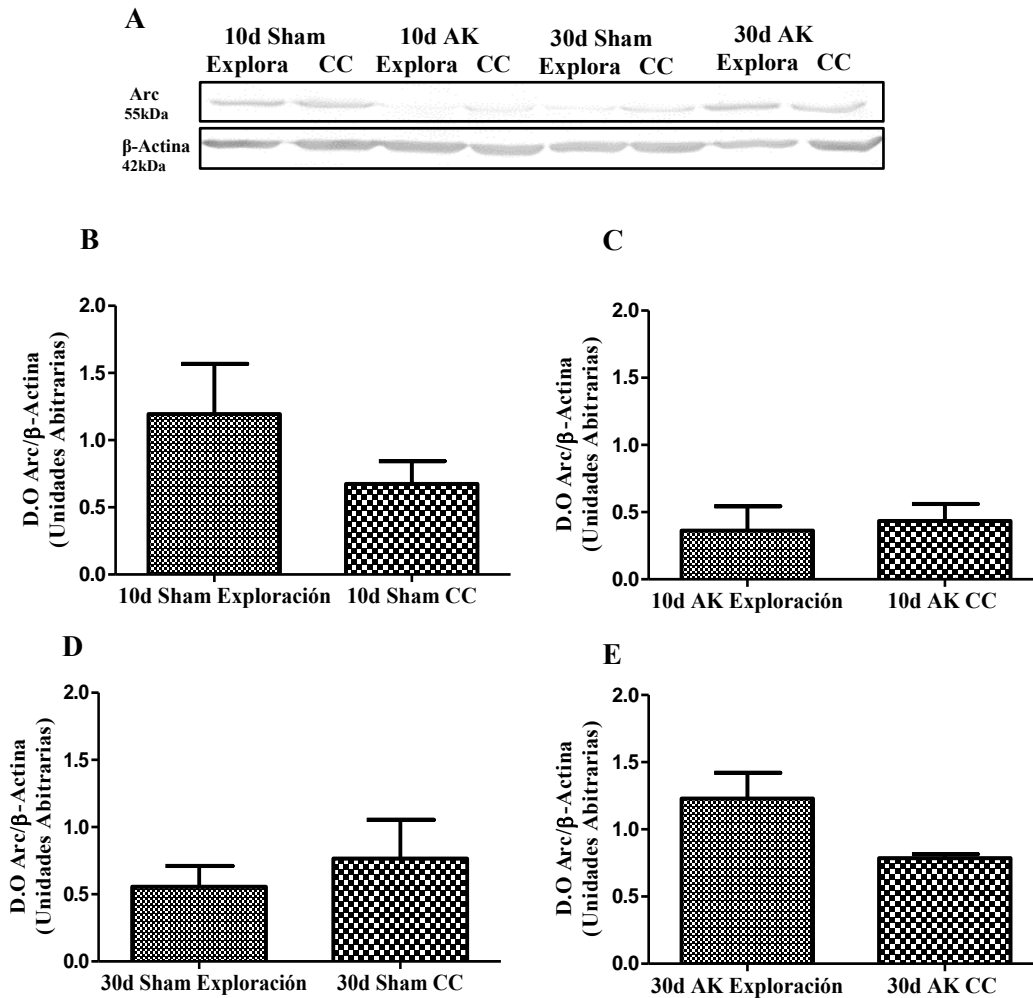


Figura 16. Expresión de Arc posterior a la evocación de la Memoria Aversiva Contextual. Comparación entre de la expresión de Arc entre los grupos a los que se les entreno a una tarea de memoria aversiva contextual y a una tarea de exploración. A) Imagen representativa de un Western blot de Arc con su respectivo control de carga β-Actina. B) Comparación entre el grupo 10d Sham Explo contra 10d Sham CC, el cual no reflejó diferencias significativas ($F(5)=1.397, p=0.221$). C) La comparación entre el grupo 10d AK Exploración y 10d AK CC, no mostró diferencias significativas entre los grupos ($F(6)=0.03279, p=0.7541$). D) La comparación entre el grupo 30d Sham Exploración contra 30d Sham CC no reflejó diferencias significativas ($F(6)=0.06440, p=0.5434$). E) Se compararon los grupos 30d AK Exploración y 30dAK CC, observándose una tendencia a aumentar en la expresión de Arc en el grupo 30d AK Exploración con respectoa al grupo 30d AK CC, sin embargo este no fue significativo ($F(6)=2.292, p=0.06$). Los datos se normalizaron con respecto a su control de carga β-Actina y se muestran las densitometrias de la densidad óptica de las unidades arbitrarias de Arc normalizado ($n=4$ por grupo, excepto la condición 10d Sham Exploración; $n=3$). Los resultados son representados con la media \pm S.E.M.

Explora: Tarea de Exploración; **CC:** Con condicionamiento; **10d AK/ 30d AK:** 10 o 30 días infusión AK; **10d Sham / 30d Sham:** 10 o 30 días introducción de cánula.

Por otra parte, también se evaluó el contenido de Arc en las dos ventanas de recuperación post tratamiento. Los resultados obtenidos muestran un aumento significativo en los niveles de Arc en los grupos 30d AK Exploración con respecto al grupo 10d AK Exploración ($p=0.01^*$) (Fig.17 D), y de la misma en el grupo 30d AK CC se observó un aumento del contenido de Arc con respecto al grupo 10d AK CC ($p=0.01^*$) (Fig.17 E). Estos cambios no se observaron entre los grupos 10d Sham y 30d Sham sometidos tanto a una tarea de exploración como a una tarea de memoria aversiva contextual (Fig.17 B, C). Estos resultados sugieren que, independientemente de la tarea, los sujetos que recibieron la infusión de AK despliegan modificaciones a nivel molecular que no despliegan los grupos sham.

Con el objeto de evaluar el impacto mismo de la infusión de AK en los niveles de Arc, se comparó, en una misma ventana de tiempo, la expresión de la proteína entre los grupos Sham y los infundidos. Los resultados mostraron diferencias entre el grupo 10d AK y 10d Sham Exploración ($F(5) = 2.190$, $p=0.08$) (Fig. 18 B). Sin embargo, si se observó un aumento estadísticamente significativo en el grupo 30d AK comparándolo con su grupo control 30d Sham Exploración ($*p=0.03$) (Fig. 18 D). Estos datos sugieren que en esta ventana de tiempo puede estar ocurriendo un re arreglo celular post daño debido a un proceso de plasticidad sináptica y funcional. Un dato interesante que se observó fue que al comprar el grupo 10d Sham con el grupo 10d AK CC y 30d Sham con el grupo 30d AK CC, no mostraron diferencias significativas (Fig. 18 C, E).

Con estos datos podemos concluir que la expresión de Arc parece modificarse con respecto a un proceso excitotóxico a lo largo del tiempo, y que su expresión parece ser más sensible en respuesta a una tarea de exploración.

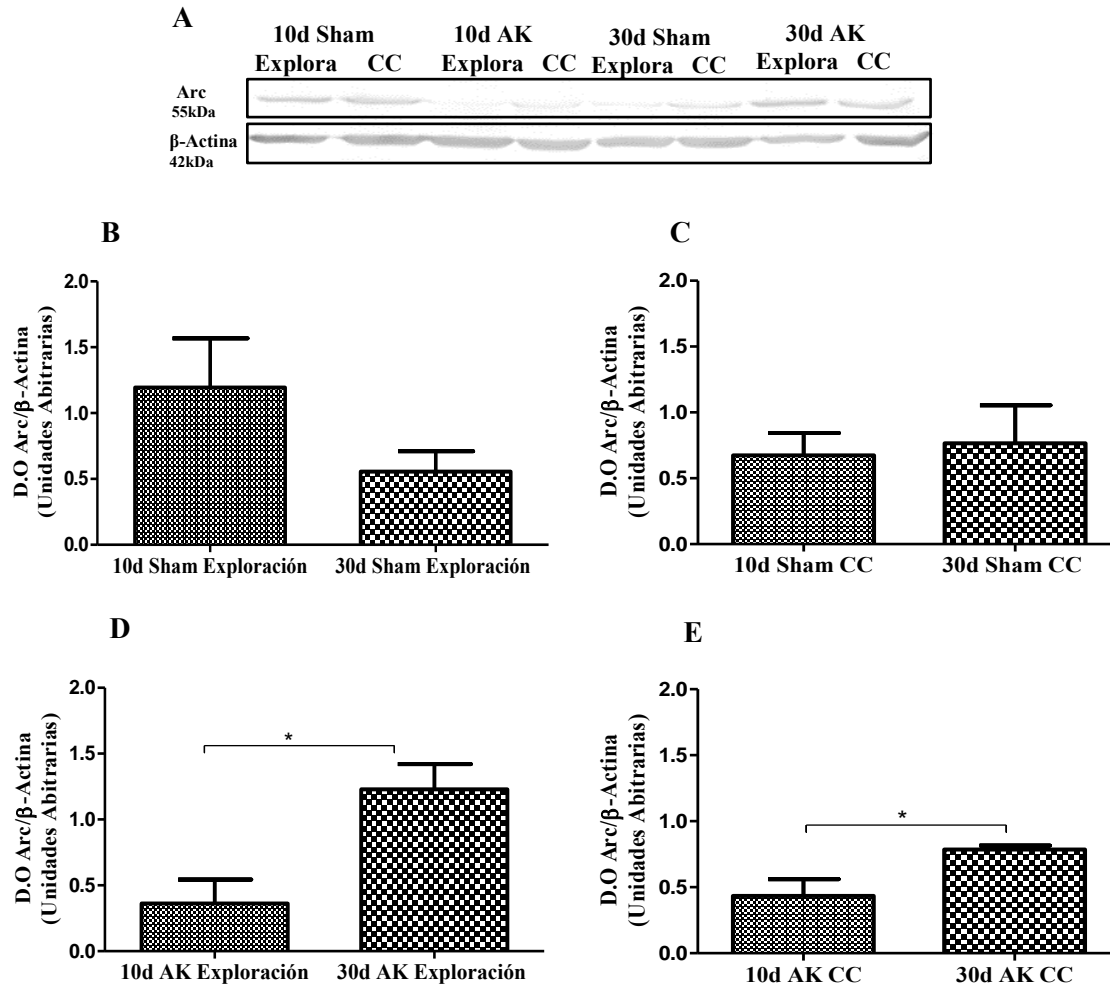


Figura 17. Expresión de Arc a través de las diferentes ventanas de tiempo (10días y 30días). Comparación de la expresión de Arc evaluada en dos ventanas de recuperación del GD a los 10 y 30 días post-infusión o cánula. A) Imagen representativa de un Western blot de Arc con su respectivo control de carga β -Actina. B) La comparación de la expresión de Arc entre grupos 10d Sham y 30d Sham Exploración no mostró diferencias significativas entre ambos grupos ($F(5) = 1.761, p = 0.1386$). C) La comparación entre el grupo 10d Sham y 30d Sham CC no arrojó diferencias significativas en la expresión de Arc entre ambos grupo ($F(6) = 0.2769, p = 0.7912$). D) La comparación entre el grupo 10d AK y 30d AK Exploración mostraron un aumento significativo en la expresión de Arc a los 30d AK con respecto a los 10d AK Exploración. ($F(6) = 3.287, *p = 0.01$). E) La comparación entre el grupo 10d AK y 30d AK CC mostró un aumento significativo en la expresión de Arc a los 30d Ak con respecto a los 10d AK en el grupo condicionado ($F(6) = 3.287, *p = 0.03$). Los datos se normalizaron con respecto a su control de carga β -Actina y se muestran las densitometrías de la densidad óptica de las unidades arbitrarias de Arc normalizado ($n = 4$ por grupo, excepto la condición 10d Sham Exploración; $n = 3$). Los resultados son representados con la media \pm S.E.M.

Explora: Tarea de Exploración; **CC:** Con condicionamiento; **10d AK/ 30d AK:** 10 o 30 días infusión AK; **10d Sham / 30d Sham:** 10 o 30 días introducción de cánula. ($*p = 0.01$)

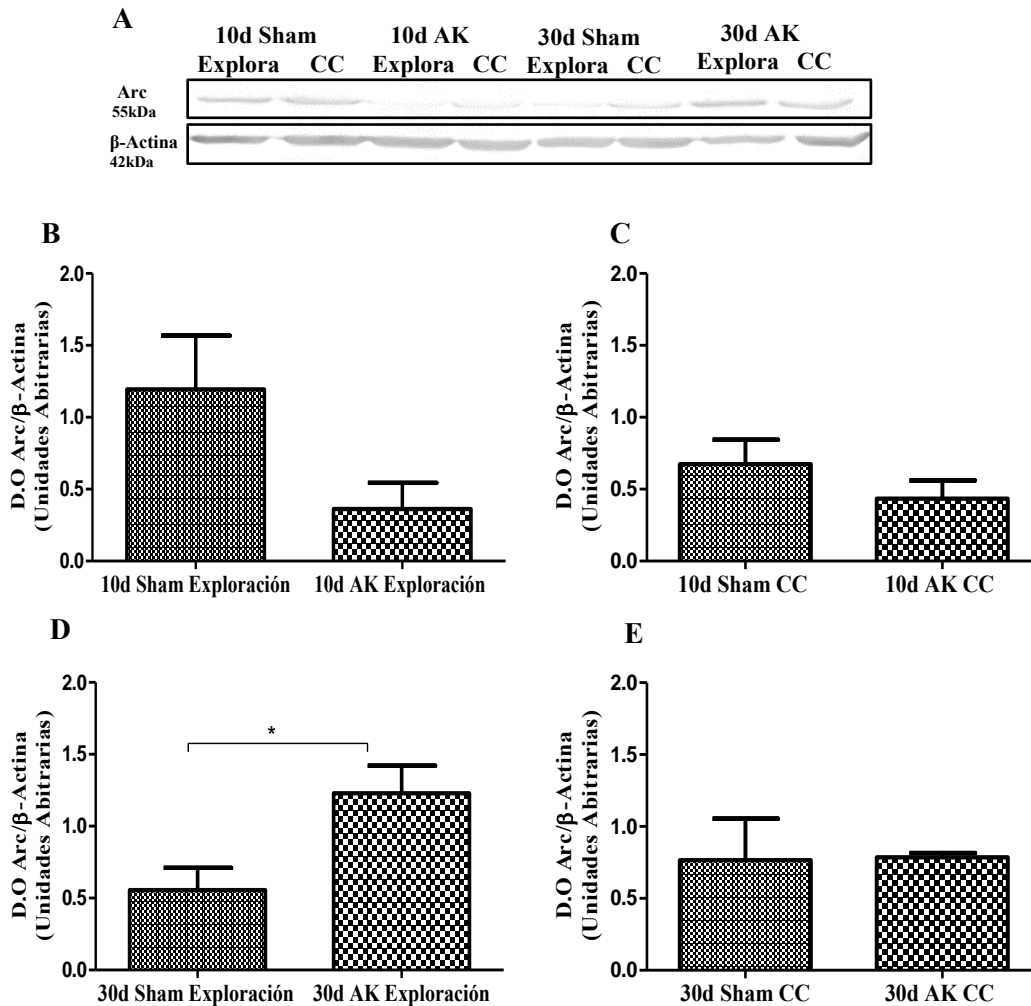


Figura 18. Expresión de Arc en GD posterior a la infusión de AK intrahipocampa comparándola con el grupo al que se introdujo solo la Cánula. Comparación de la expresión de Arc post- tratamiento. A) Imagen representativa de un Western blot de Arc con su respectivo control de carga β -Actina. B) La comparación entre el grupo 10d Sham y 10d AK Exploración no reflejó diferencias significativas entre estos grupos ($F(5) = 2.190, p = 0.08$), sin embargo, se observó una disminución en la expresión de Arc en el grupo 10dAK Exploración comparado con el grupo control 10d Sham Exploración. C) La comparación entre el grupo 10d Sham y 10d AK CC no mostró diferencias significativas entre ambos grupo ($F(6) = 1.123, p = 0.3042$). D) La comparación entre el grupo 30d Sham y 30d AK Exploración mostró un aumento estadísticamente significativo en la expresión de Arc en el grupo 30d AK Exploración comparado con su grupo control 30d Sham Exploración ($F(6) = 2.741, *p = 0.03$). E) La comparación entre el grupo 30d Sham y 30d AK CC no mostró cambios estadísticamente significativos ($F(6) = 0.6881, p = 0.9474$). Los datos se normalizaron con respecto a su control de carga β - Actina y se muestran las densitometrías de la densidad óptica de las unidades arbitrarias de Arc normalizado. (n=4 por grupo, excepto la condición 10d Sham Exploración; n=3). Los resultados son representados con la media \pm S.E.M.

Explora: Tarea de Exploración; **CC:** Con condicionamiento; **10d AK/ 30d AK:** 10 o 30 días infusión AK; **10d Sham / 30d Sham:** 10 o 30 días introducción de cánula. (* $p = 0.03$)

8. DISCUSIÓN

El cerebro del mamífero es un órgano plástico en la medida en que las células que lo componen tienen la capacidad de responder de forma dinámica al ambiente, a la experiencia y al daño. Las manifestaciones de la plasticidad a consecuencia de daño, incluyen cambios tanto celulares, como moleculares que pueden subyacer procesos de neuroreparación, pero también pueden inducir eventos aberrantes, o maladaptativos (Artinian *et al.*, 2015; Zepeda *et al.*, 2004; Zepeda *et al.*, 2013; Nudo, 2006). Una de las regiones de particular interés para el estudio de la plasticidad neuronal es el GD de la formación hipocampo, en la cual se ha descrito ocurren modificaciones continuas como consecuencia de procesos como el aprendizaje y la memoria, pero también se ha visto que tiene la capacidad de reorganizarse en consecuencia a un daño (Ogita *et al.*, 2005; Hernandez-Ortega *et al.*, 2007; Zepeda *et al.*, 2013).

En el presente trabajo se encontró que posterior a un proceso excitotóxico hipocampal, ocurren modificaciones en moléculas reporteras de sinaptogénesis, plasticidad sináptica y funcional en el GD en un periodo de 10 a 30 días post infusión de AK, y estas modificaciones parecen hacerse más evidentes en respuesta a una tarea de exploración.

Con el objetivo de activar específicamente el GD posterior a la infusión excitotóxica intrahipocampal de AK, se sometió a un grupo de sujetos experimentales a una tarea de evocación aversiva contextual y a otro grupo a una tarea de exploración. Nuestros resultados mostraron que, después de la infusión de AK, no hubo alteraciones en el aprendizaje asociativo, tal como se ha observado previamente (Zepeda *et al.*, 2013). Tampoco se observó pérdida de la MAC. Esto se contrapone con resultados previos del laboratorio en los que se mostró que la infusión focal de AK en el GD provocaba daño y pérdida de la formación de la MAC evaluada a los 10 días post infusión de AK (Zepeda *et al.*, 2013). La aproximación experimental de dicho trabajo, permitió corroborar por medios hisológicos y en cada uno de los sujetos infundidos, el alcance del AK en el GD. A diferencia de aquel, En el presente trabajo, no fue posible analizar en cada sujeto el alcance del fármaco, de manera que se contempla la posibilidad de que el daño haya impactado en diferentes regiones del hipocampo, sin afectar focalmente al GD. Esto, permitiría explicar por qué la MAC no se afectó como consecuencia de la lesión. Acorde a esta idea, los datos

arrojados por el análisis de contenido de NeuN de GD, no mostraron diferencias significativas entre los grupos a los que se les infundió AK y a los que se les intridujo la cánula. El análisis de Nissl realizado en un grupo independiente de infusión de AK, también mostró variabilidad en el alcance del AK y en la fragmentación de la capa granular del GD. De esta manera, la similitud en los niveles de NeuN, podrían reflejar la variabilidad del daño y la disección del GD completo, podría haber diluido el efecto del AK.

Dado que en todo el hipocampo hay receptores tipo kainato (Carta *et al.*, 2014), la infusión del fármaco afecta en mayor o menor medida las regiones que lo componen. Y debido a que el GD forma un circuito con otras regiones del hipocampo y que la alteración de una de las regiones de esta estructura afecta el funcionamiento de las demás, al observar daño discreto en GD, núcleos picnoticos en hilus y CA3, quisimos analizar como parte del proceso de plasticidad posterior a un proceso excitotóxico, la posibilidad de que tanto en las neuronas remanentes, como en aquellas que se generaron después de la infusión excitotóxica y acompañado de una tarea específica del GD (la evocación de la MAC o una tarea de exploración) se modificara la expresión de algunas proteínas asociadas a la reorganización sináptica, como su funcionalidad.

Por ello, se decidió evaluar la expresión de proteínas sinápticas como SYP una glicoproteína asociada a la membrana de vesículas sinápticas en la presinápsis, indicadora de sinaptogénesis, y la proteína PSD-95, proteína de andamiaje situada en la densidad postsináptica de botones dendríticos. Ambas se emplearon como un correlato de modificaciones plásticas en la ultraestructura sináptica de neuronas en el GD, también observándose la proteína de Arc (proteína asociada a la actividad regulada por el citoesqueleto) un gen de expresión temprana modulado por actividad sináptica y que se sabe tiene un papel importante en remodelación del citoesqueleto de espinas dendríticas.

8.1 Modificación en proteínas sinápticas y funcionales posterior a una tarea de exploración y al paradigma de MAC

Los resultados observados en la expresión proteica, comparando el efecto de la evocación de la MAC con el efecto de exploración, no mostraron diferencias significativas en la expresión de PSD-95, SYP o Arc entre ninguno de los grupos.

Existe evidencia de que después de procesos de aprendizaje y memoria, ocurren modificaciones estructurales en sitios postsinápticos de espinas dendríticas. Estas modificaciones actividad-dependientes se han observado posterior a la inducción de la LTP y 24 horas posteriores al aprendizaje de una tarea de condicionamiento de parpadeo, en los que se demostró un aumento del número de espinas dendríticas, múltiples botones dendríticos y sinapsis perforadas (Lampercht y LeDoux, 2004). Asimismo, Nithianantharajah y Murphy (2008), encontraron que posterior a la evocación de una tarea de Condicionamiento Aversivo al tono hubo un aumento significativo en niveles de SYP en la Amígdala Baso Lateral de ratones condicionados en comparación con los controles 6 horas posterior al entrenamiento. Siguiendo esta línea, O'Malley y colaboradores (1998) también observaron cambios en la densidad de espinas 6 horas posteriores al entrenamiento de tareas de aprendizaje motivadas por el miedo. Tal cambio podría resultar de un aumento de la densidad de vesículas sinápticas, o como parte de un aumento más general en tamaño o número de sinapsis. En otros estudios también se ha evaluado la importancia de la expresión de PSD-95 en la formación de memorias espaciales (Migaud *et al.*, 1998), así como en la formación de memorias aversivas contextuales, y se ha reportado que su ablación resulta en un déficit conductual de dichas tareas (Nagura *et al.*, 2012). En contraposición a esta evidencia, nuestros datos mostraron que posterior a la evocación de una memoria aversiva al contexto no se observaron cambios en el contenido de estas proteínas sinápticas ni en animales “sham” ni en los grupos post-infusión. En esta tesis, la evaluación de la MAC se realizó 24 horas posteriores al entrenamiento y los animales se sacrificaron 30 minutos después de la evocación de la memoria., esto nos podría indicar que tal vez esta ventana temporal post-evocación no fue suficiente para evidenciar cambios significativos en estas proteínas, en las tareas evaluadas.

Por otro lado, pudimos observar una tendencia a disminuir el contenido de Arc en los grupos 30d AK CC comparándolo con 30d AK exploración (Fig. 16 E). Resultados de diferentes estudios muestran que la expresión de Arc ocurre tanto en respuesta a una tarea de exploración espacial (Ramírez- Amaya *et al.*, 2005), como de una tarea de memoria aversiva contextual (Besnard *et al.*, 2012; Chia y Otto, 2013). De esta forma en este trabajo pudimos comparar la expresión de Arc en dos tipos de memorias en sujetos infundidos con AK. Nuestros resultados muestran que la expresión de Arc parecería ser más sensible ante

una tarea de exploración, que ante una tarea de memoria aversiva. Esta tarea tiene un componente de estrés que puede resultar en el fortalecimiento de una memoria o también en procesos como el encogimiento de espinas dendríticas (Kim *et al.*, 2006), lo cual pudiera ayudar a explicar el aumento de Arc ante la tarea de exploración, pero no ante la tarea de la evocación aversiva.

8.2 Modificación en proteínas sinápticas y funcionales a lo largo del tiempo (10 días y 30 días) posterior a la infusión de ácido kaínico

La comparación del contenido de las proteínas de interés en las diferentes ventanas de tiempo (10 días y 30 días) posterior a la infusión intrahipocampal de AK, mostró que la expresión de la proteína PSD-95 no se modificó a lo largo del tiempo en ningún grupo (Fig. 14). Sin embargo, los niveles de SYP y Arc mostraron un aumento estadísticamente significativo en los grupos 30d AK Exploración al compararlos contra el grupo 10d AK Exploración (Fig. 11 D; Fig. 17 D), este aumento también se observó en el grupo 30d AK CC al compararlo con el grupo 10d AK CC para Arc (Fig. 17 E). De la misma forma, se observó una tendencia a aumentar el contenido de SYP en el grupo 30d AK CC comparándolo con el grupo 10d AK CC (Fig. 11 E).

Estos resultados muestran un patrón particular de SYP y Arc a lo largo del tiempo en sujetos a los que se le infundió AK, no así en sujetos a los que solo se les introdujo la cánula. Esto sugiere que, en los animales infundidos con AK está ocurriendo un proceso plástico dependiente del tiempo que no sucede en animales controles. De forma interesante se observa que el aumento de SYP y Arc hacia los 30 días en los animales con AK ocurre tanto ante una tarea de exploración, como de evocación de la MAC, confirmando que estos cambios son independientes de las tareas cognitivas a las que fueron sometidos los sujetos. En animales adultos las primeras sinapsis se forman en aproximadamente 5-9 días después de una lesión; la sinaptogénesis puede continuar durante 1-2 meses post lesión (Cotman, 1979). Estos datos apoyan nuestros resultados pues a tiempos cortos posteriores a la infusión de AK pudimos observar niveles bajos tanto de SYP como de Arc, sin embargo, estos aumentaron 30 días posteriores a la infusión del AK posiblemente como una respuesta de plasticidad sináptica y funcional debido al daño excitotóxico. Por su parte nuestros resultados coinciden con lo antes reportado por Thompson y colaboradores (2014), pues

también encontraron un aumento de SYP en el hipocampo a lo largo del tiempo posterior a un daño por traumatismo craneo encefálico (TCE).

Arc es una molécula reportera de activación sináptica, su expresión se ha observado en neuronas en etapas post-mitóticas (Bramham *et al.*, 2010), su expresión requiere de la maquinaria adecuada para responder estímulos que provoquen la despolarización neural. Por ello, posiblemente, nuestros resultados reflejen la capacidad de algunas células del GD, que no estaban inicialmente involucradas en una tarea, de activarse y/o de reclutarse funcionalmente hacia los 30, pero no hacia los 10 días post infusión de AK.

8.3 Modificación en proteínas sinápticas y funcionales posterior a la infusión intrahipocampal de ácido kaínico (AK)

Por último se evaluó si la infusión misma de AK modificaba la expresión de las proteínas sinápticas SYP y PSD-95, así como de la proteína Arc. Los resultados muestran que la expresión de la proteína PSD-95 no se modifica posterior a la infusión de AK, pues sus niveles fueron similares a los del grupo al que solo se introdujo la cánula (Fig. 15).

Datos observados por Campbell y colaboradores (2012), reportan que 24 horas después de modelo de TCE, los niveles de PSD-95 disminuyen en el hipocampo ipsilateral al trauma, y aun a las 48 horas la expresión de la proteína continúa baja comparándola con el grupo control. En nuestro trabajo no se observaron disminuciones post infusión de AK, que es una entrada masiva de calcio, sin embargo, hay que tomar en cuenta que en la evidencia previa las ventanas de tiempo de evaluación de PSD-95 fueron muy próximas al daño y su evaluación fue hasta las 48 horas post TCE, mientras que las nuestra ventana de evaluación fueron en tiempos más posteriores a los reportados (10 días y 30 días), y tal vez por ello no encontramos cambios significativos en los niveles del contenido de PSD-95 en el presente trabajo.

El ensamblaje de PSD-95 correlaciona espacial y temporalmente con la morfología de espinas dendríticas, por ello, se ha propuesto que la proteína PSD-95 gobierna la morfogénesis dendrítica (Okabe *et al.*, 2001), sin embargo, ratones mutantes de PSD-95

exhiben morfología de espinas dendríticas normal (Migaud *et al.*, 1998). Esto sugiere que PSD-95 no se encarga directamente de la morfogénesis de espinas, y por otro lado la disrupción de actina en el citoesqueleto conlleva al desensamblaje de elementos de la estructura sináptica, lo que sugiere que la actina ensambla proteínas de anclaje a sitios postsinápticos y gobierna la morfogénesis dendrítica. Por lo tanto, es evidente que la actina del citoesqueleto es más responsable que la PSD para la morfogénesis de espinas (Sekino *et al.* 2007). De esta forma, un mejor indicador de cambios más robustos sería evaluar otras proteínas en conjunto con PSD-95, como receptores membranales glutamatérgicos, proteínas que se han visto asociadas a modificaciones en la PSD y en modificaciones morfológicas de espinas dendríticas como proteínas que se unen a actina como Shank y Homer, que pueden ser un mejor correlato de modificaciones morfológicas dendríticas y sinápticas.

Por otro lado, en el contenido de SYP no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en su expresión posterior a la infusión de AK, sin embargo, se observan tendencias interesantes en SYP y Arc: 1) Los niveles de SYP fueron menores en el grupo 10d AK en relación al grupo 10d Sham, lo que sugiere que el AK generó un desbalance a nivel sináptico; 2) en el grupo 30d AK Exploración, se observó una tendencia en aumento de SYP al compararse con el grupo 30d Sham Exploración (Fig.12 A). Esta tendencia es inversa a la observada en la comparación 10d AK contra el grupo 10d Sham (ambos exploración), en la que se observa una disminución de SYP en el grupo 10d AK. La disminución y posterior aumento de la proteína presináptica SYP con el transcurso del tiempo post daño, podría ser un indicativo de un proceso de sinaptogénesis reactiva tal como se ha seguido en estudios previos (Masliah *et al.*, 1991; Thompson *et al.*, 2006); 3) Los niveles en el contenido de Arc también se mostraron disminuidos en el grupo 10d AK Exploración con respecto al grupo 10d Sham, aunque esta no fue significativa (Fig.18 A), sin embargo, si se observó un aumento estadísticamente significativo de la expresión de Arc en el grupo 30d AK Exploración comparado con su grupo control 30d Sham Exploración (Fig.18 D), lo que indica que tanto proteínas funcionales como Arc como SYP se modifican a lo largo del tiempo en presencia de un estímulo excitotóxico como un posible proceso plástico compensatorio que ocurren en el sistema, y de forma interesante estos cambios son más notorios en los grupos expuestos a una tarea de exploración más que

a una tarea aversiva contextual, pues en los grupos que se les condicionó no se observan cambios significativos comparando los grupos Sham con los infundidos con AK en una tarea de MAC.

Estos resultados permiten concluir que a la par de los eventos de plasticidad celular y funcional que ocurren en respuesta al daño del hipocampo, también se dan eventos moleculares que pudieran contribuir a la reorganización de la estructura, y que estos cambios son más robustos en compañía de una tarea específica.

Por otro lado, se ha observado que la sobre activación neuronal inducida por la infusión local AK afecta subregiones del hipocampo en las que se concentran receptores post-sinápticos de kainato las neuronas piramidales CA3-CA1 y en las células granulares del GD o en receptores presinápticos en las fibras musgosas (Carta *et al.*, 2014). A niveles moleculares y celulares, se ha observado que convulsiones inducidas por AK están asociadas con la activación de una cascada de eventos que incluyen la expresión génica, surgimiento de fibras musgosas, y el establecimiento de nuevos contactos sinápticos. Juntos, estos cambios participan en la inducción de plasticidad reactiva que también pueden implicar la formación de conexiones aberrantes (Artinian *et al.*, 2015). Aun cuando nuestra dosis de AK no mostro crisis tónico-clónicas, ni conductas estereotipadas o atípicas, cabe la posibilidad de que estos cambios en la expresión a la alta de estas proteínas sinápticas y de funcionalidad puedan ser una muestra de una respuesta plástica aberrante y no positiva. Con el fin de aclarar esta pregunta, en la extensión del presente trabajo se podría evaluar la morfología dendrítica por medio de estudios inmunohistoquímicos o por medio de la técnica de tinción Golgi en GD.

9. CONCLUSIONES

En condiciones fisiológicas, la evocación de la memoria aversiva contextual, tarea propia del GD no se acompaña de modificaciones significativas en los niveles del contenido de proteínas sinápticas, como SYP, PSD-95 o Arc en comparación con los grupos sometidos a una tarea de exploración.

Los niveles de las proteínas SYP y Arc mostraron una tendencia a aumentar hacia los 30 días después de la infusión de AK con respecto a los grupos evaluados a 10 días post tratamiento, lo que sugiere que está ocurriendo una respuesta plástica dependiente del tiempo, y este aumento es dependiente del tratamiento, ya en el grupo de sujetos expuestos únicamente a la cánula no se observó tal efecto, aunado a esto, se pudo observar que estos cambios fueron más evidentes en el grupo al que fue sometido a una tarea de exploración post daño excitotóxico, comparándolos con los grupos sometidos a una tarea aversiva contextual.

10. REFERENCIAS

- Aguilar-Arredondo A. (2011) *Evaluación de la Reorganización anatómica funcional del Giro Dentado después de una lesión excitotóxica: papel de la neurogénesis*, Tesis, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Psicología UNAM, pp. 1-63.
- Anderson P. (2007) *The hippocampus book*, EU: Oxford University Press.
- Artinian J, Peret A, Mircheva Y, Marti G, Crépel V. (2015) *Impaired neuronal operation through aberrant intrinsic plasticity in epilepsy*. *Ann Neurol*. 77: 592-606.
- Azmitia EC. (2007) *Cajal and brain plasticity: Insights relevant to emerging concepts of mind*. *Brain Res Rev*. 55 (2): 395–405.
- Besnard A, Laroche S, Caboche J. (2012) *Comparative dynamics of MAPK/ERK signalling components and immediate early genes in the hippocampus and amygdala following contextual fear conditioning and retrieval*. *Brain Struct Funct*. 219(1):415-430.
- Bidmon HJ, Jancsik V, Schleicher A, Hagemann G, Witte OW, Woodhams P, Zilles K. (1998) *Structural alterations and changes in cytoskeletal proteins and proteoglycans after focal cortical ischemia*. *Neurosci*. 82(2): 397-420.
- Brailowsky S, Stein D, Will B. (1998) *El cerebro averiado: Plasticidad cerebral y recuperación funcional*. (2º Ed.) México: Fondo de Cultura Económica, pp. 9-240.
- Bramham CR, Alme MN, Bittins M, Kuipers SD, Nair RR, Pai B, Panja D, Schubert M, Soule J, Tiron A, Wibrand K. (2010) *The Arc of synaptic memory*. *Exp Brain Res*. 200:125–140.
- Bramham CR, Worley PF, Moore MJ, Guzowski JF. (2008) *The Immediate Early Gene Arc/Arg3.1: Regulation, Mechanisms, and Function*. *J Neurosci*. 28(46):11760–11767.
- Briones TL, Suh E, Jozsa L, Woods J. (2006) *Behaviorally induced synaptogenesis and dendritic growth in the hippocampal region following transient global cerebral ischemia are accompanied by improvement in spatial learning*. *Exp Neurol*. 198(2):530–538.

- Campbell J, Low B, Kurz J, Patel S, Young M, Churn S. (2012) *Mechanisms of Dendritic Spine Remodeling in a Rat Model of Traumatic Brain Injury*. J Neurotrauma. 29(2):218–234.
- Carta M, Fièvre S, Gorlewicz A, Mulle C. (2014) *Kainate receptors in the hippocampus*. Eur J Neurosci. 39: 1835-44.
- Cheatwood JL, Emerick AJ, Kartje GL. (2008) *Neuronal Plasticity and Functional Recovery After Ischemic Stroke*. Top Stroke Rehabil. 15(1):42-50.
- Chia C y Otto T. (2013) *Hippocampal Arc (Arg3.1) expression is induced by memory recall and required for memory reconsolidation in trace fear conditioning*. Neurobiol Learn Mem. 106: 48–55.
- Cotman C. (1979) *Specificity of synaptic growth in brain: remodeling induced by kainic acid lesions*. Prog Brain Res. 51:203-15.
- Darian-Smith C, Gilbert C D. (1994) *Axonal sprouting accompanies functional reorganization in adult cat striate cortex*. Nature. 368(6473):737-40.
- Deller T , Frotscher M. (1997) *Lesion-induced plasticity of central neurons: sprouting of single fibres in the rat hippocampus after unilateral entorhinal cortex lesion*. Prog. Neurobiol. 53(6):687-727.
- Deng W, Aimone JB, Cage FH. (2010) *New Neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory?*. Nat Rev Neurosci.: 11(5) :339-350.
- Ding Y, Kastin AB, Pan W. (2005) *Neural Plasticity After Spinal Cord Injury*. Curr Pharm Des. 11(11): 1441–1450.
- 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.

- Hernandez-Ortega K, Ferrera P, Arias C. (2007) *Sequential expression of cell-cycle regulators and Alzheimer disease-related proteins in entorhinal cortex after hippocampal excitotoxic damage*. J Neurosci Res. 85(8):1744-51.
- Hernández-Rabaza V, Hontecillas-Prieto L, Velázquez-Sánchez C, Ferragud A, Pérez-Villaba A, Arcusa A, Barcia JA, Trejo JL, Canales JJ. (2008) *The hippocampal dentate gyrus is essential for generating contextual memories of fear and drug-induced reward*. Neurobiol Learn Mem. 90(3):553–559.
- Jenkins WM, Merzenich MM. (1987) *Reorganization of neocortical representations after brain injury: a neurophysiological model of the bases of recovery from stroke*. Prog Brain Res. 71; 249-266.
- Jones TA, Schallert T. (1992) *Overgrowth and sprouting of dendrites in adult rats recovering from neocortical damage*. Brain Res. 581:156-160.
- Kim JH, Liao D, Lau LF, Huganir R L. (1998) *SynGAP: a Synaptic RasGAP that Associates with the PSD-95/SAP90 Protein Family*. Neuron. 20(4):683-691.
- Kim JJ, Song EY, Kosten TA. (2006) *Stress effects in the hippocampus: synaptic plasticity and memory*. Stress. 9(1):1-11.
- Lamrecht R, LeDoux J. (2004) *Structural plasticity and memory*. Nat Rev Neurosci.5(1):45-54.
- Lanahan A, Worley P. (1998) *Immediate-Early Genes and Synaptic Function*. Neurobiol Learn Mem. 70(1-2):37-43.
- Liquitaya-Montiel A, Aguilar-Arredondo A, Arias A, Zepeda A. (2012) *Insulin Growth Factor-1 Promotes Functional Recovery After a Focal Lesion in the Dentate Gyrus*. CNS Neurol Disord Drug Targets. 11(7):818-28.
- Lyford GL, Yamagata K, Kaufmann WE , Barnes C, Sanders LK, Copeland NG, Gilbert D, 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.

Maren S, Phan KL, Liberzon I. (2012) *The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology*. Nature Rev. 14: 417-428.

Maslah E, Fagan AM, Terry R, DeTeresa R, Mallory M, Gage F. (1991) *Reactive Synaptogenesis Assessed by Synaptophysin Immunoreactivity is Associated with GAP-43 in the Dentate Gyrus of Adult Rat*. Exp Neurol. 113(2): 131-142.

Meconia A, Lui E, Marrone DF. (2015) *Sustained Arc Expression in Adult-Generated Granule Cells*. Neurosci Lett. 603:66-70.

Merzenich MM, Kaas JH, Wall J, Nelson RJ, Sur M, Felleman D. (1983) *Topographic Reorganization of Somatosensory Cortical Areas 3b and 1 in Adult Monkeys Following Restricted Deafferentation*. JNeurosci. 8(1): 33-55.

Messaoudi E, Kanhema T, Soulé J, Tiron A, Dageyte G, da Silva B, Bramham CR. (2007) *Sustained Arc/Arg3.1 Synthesis Controls Long-Term Potentiation Consolidation through Regulation of Local Actin Polymerization in the Dentate Gyrus In Vivo*. JNeurosci. 27(39):10445-55.

Migaud M, Charlesworth P, Dempster M, Webster L C, Watabe A M, Makhinson M, He Y, Ramsay M F, Morris R G M, Morrison J M, O'Dell T M, Grant S. (1998) *Enhanced Long-Term Potentiation and Impaired Learning in Mice with Mutant Postsynaptic Density-95 Protein*. Nature, 396:433-439.

Morin JP, Quiroz C, Mendoza-Viveros L, Ramirez-Amaya V, Bermudez-Rattoni F. (2011) *Familiar Taste Induces Higher Dendritic Levels of Activity-Regulated Cytoskeleton-Associated Protein in the Insular Cortex than a Novel One*. Learn. Mem, 18: 610-616.

Nagura H, Ishikawa Y, Kobayashi K, Takao K, Tanaka T, Nishikawa K, Tamura H, Shiosaka S, Suzuki H, Tsuyoshi Miyakawa T, Fujiyoshi Y, Doi T. (2012) *Impaired Synaptic Clustering of Postsynaptic Density Proteins and Altered Signal Transmission in Hippocampal Neurons, and Disrupted Learning Behavior in PDZ1 and PDZ2 Ligand Binding Deficient PSD-95 Knockin Mice*. Mol Brain. 5:43.

Nithianantharajah J, Murphy M. (2008) *Auditory specific fear conditioning results in increased levels of synaptophysin in the basolateral amygdala*. *Neurobiol Learn Mem.* 90(1):36-43.

Nudo R. (2006) *Plasticity*. *NeuroRx.* 3: 420–427.

Nudo RJ , Milliken GW. (1996) *Reorganization of movement representations in primary motor cortex following focal ischemic infarcts in adult squirrel monkeys*. *J Neurophysiol.* 75: 2144-2149.

Nudo RJ. (2013) *Recovery after brain injury: mechanisms and principles*. *Front Hum Neurosci.* 7 (887): 1-14.

Ogita K, Nishiyama N, Sugiyama C, Higuchi K, Yoneyama M, Yoneda Y. (2005) *Regeneration of granule neurons after lesioning of hippocampal dentate gyrus: evaluation using adult mice treated with trimethyltin chloride as a model*. *J Neurosci Res.* 1; 82 (5): 609-21.

Okabe S, Miwa A., Okado H. (2001) *Spine formation and correlated assembly of presynaptic and postsynaptic molecules*. *J. Neurosci.* 21, 6105–6114

O'malley A, O'connell C ,Regan M. (1998) *Ultrastructural analysis reveals avoidance Conditioning to induce a transient increase in Hippocampal dentate spine density in the 6 hour Post-training period of consolidation*. *Neurosci.* 87(3): 607-613.

Paxinos G, Watson C. (1989) *The rat brain in stereotaxic coordinates*.

Pérez-Gómez A, Tasker RA. (2014) *Enhanced Mossy Fiber Sprouting and Synapse Formation in Organotypic Hippocampal Cultures Following Transient Domoic Acid Excitotoxicity*. *Neurotox Res.* 25:402-410

Plath N, Ohana O, Dammermann B ,Errington M, Schmitz D, Gross C, Mao X, Engelsberg A, Mahlke C, Welzl H, Kobalz U, Stawrakakis A, Fernandez E, Waltereit R, Bick-Sander A, Therstappen E, Cooke S, Blanquet V, Salmen B, Bösl M , Lipp HP, Grant S, Bliss T V P, Wolfer D P, Kuhl D.(2006) *Arc/Arg3.1 Is Essential for the Consolidation of Synaptic Plasticity and Memories*. *Neuron.* 52: 437-444.

Ramírez-Amaya V, Vazdarjanova A, Mikhael D, Rosi S, Worley P F, Barnes C. (2005) *Spatial Exploration-Induced Arc mRNA and Protein Expression: Evidence for Selective, Network-Specific Reactivation*. J Neuroscience. 25(7):1761-1768.

Scharfman, HE. (2007). The CA3“backprojection” to the dentate gyrus. Prog. Brain Res. 163,627–637

Schwartzkroin, P. A., Scharfman, H. E., and Sloviter, R. S. (1990). *Similarities in circuitry between Ammon’s horn and dentate gyrus: local interactions and parallel processing*. Prog. Brain Res. 83,269–286.

Sekino Y, Kojima N, Shirao T. (2007) *Role of actin cytoskeleton in dendritic spine morphogenesis*. Neurochem Int. 51(2-4):92-104

Thompson SN, Gibson TR, Thompson BM, Deng Y, Hall ED. (2006) *Relationship of calpain-mediated proteolysis to the expression of axonal and synaptic plasticity markers following traumatic brain injury in mice*. Exp Neurol. 201(1):253-265.

Treves A, Tashiro A, Witter MP, Moser EI. (2008) *What is the mammalian dentate gyrus good for?*. Neurosci. 154: 1155-1172.

Valtorta F, Pennuto M, Bonanomi D, Benfenati F. (2004) *Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis?*. Bio Essays. 26:445–453.

Waites CL, Craig AM, Garner CC. (2005) *Mechanisms of Vertebrate Synaptogenesis*. Annu Rev Neurosci. 28:251-274.

Wieloch T, Nikolich K. (2006) *Mechanisms of neural plasticity following brain injury*. Curr Opin Neurobiol. 16(3):258-264.

Xu W. (2011) *PSD-95-like membrane associated guanylate kinases (PSD-MAGUKs) and synaptic plasticity*. Curr Opin Neurobiol. 21(2):306-312.

Zepeda A, Aguilar-Arredondo A, Miche G, Ramos-Languren LE, Escobar LM, Arias C. (2013) *Functional recovery of the dentate gyrus after a focal lesion is accompanied by structural reorganization in the adult rat*. Brain Struct Funct. 218(2):437-53.

Zepeda A. (2004) *Modificaciones Bioquímico-funcionales en la corteza visual de gato como resultado de una lesión isquémica Focal cortical*. Tesis, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM, pp. 1-65.

Zepeda A, Sengpiel F, Guagnelli AM, Vaca L, Arias C. (2004) *Functional Reorganization of Visual Cortex Maps after Ischemic Lesions Is Accompanied by Changes in Expression of Cytoskeletal Proteins and NMDA and GABAA Receptor Subunits*. J Neurosci. 24(8):1812-1821.

Zhang L, Zhao Q, Chen C, Qin Q, Zhou Z, Yu Z. (2014) *Synaptophysin and the dopaminergic system in hippocampus are involved in the protective effect of rutin against trimethyltin-induced learning and memory impairment*, Nutr Neurosci. 17(5):222-229.