

64
2es.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE PSICOLOGIA

ESTUDIO DE LA REORGANIZACION SINÁPTICA DE
LAS FIBRAS MUSGOSAS HIPOCAMPALES DE LA
RATA TRAS LA EJECUCION DE UNA TAREA
ESPACIAL (LABERINTO DE AGUA)

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
LICENCIADO EN PSICOLOGIA
P R E S E N T A:
VINCENT CHAO VILLALOBOS

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MARTHA LILIA ESCOBAR RODRIGUEZ

MEXICO, D. F.

264646
1998



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS:

**ILEANA ALCOCER
FEDERICO BERMUDEZ
MARTHA ESCOBAR
RANIER GUTIERREZ
VICTOR RAMIREZ
RICARDO SILVA
COMPAÑEROS DEL LABORATORIO 201**

APOYO EN DENSITOMETRIA DE IMAGENES:

TERESA MONTIEL

APOYO TECNICO:

ORESTE CARBAJAL

**ESTOY ESPECIALMENTE AGRADECIDO CON AQUELLAS PERSONAS QUE
TIENEN UN EJEMPLAR DE ESTA TESIS EN SUS MANOS**

INDICE

I. Antecedentes y esquema del trabajo	2
II. El hipocampo: una estructura relacionada con el aprendizaje y la memoria	4
IIa. Consideraciones anatómicas	5
IIb. El hipocampo y los procesos de aprendizaje espacial	7
IIc. La actividad eléctrica en el hipocampo	9
III. Las fibras musgosas	11
IIIa. Consideraciones anatómicas	12
IIIb. Consideraciones electrofisiológicas y bioquímicas	15
IIIc. Las fibras musgosas y los procesos de aprendizaje y memoria	16
IV. Reorganización sináptica en el SNC	18
IVa. Reorganización sináptica de las fibras musgosas durante la ontogenia	19
IVb. Efectos de los ambientes enriquecidos	20
IVc. La actividad eléctrica y la reorganización sináptica en el SNC	22
V. Planteamiento del problema	27
VI. Procedimiento	28
VIa. Sujetos	29
VIb. Laberinto de agua	29
VIc. Prevención pasiva	29
VId. Técnica histológica de Timm	30
VIe. Análisis por densitometría de imágenes digitalizadas	32
VI f. Descripción de las fases experimentales	32
VI f.1. Fase I	32
VI f.2. Fase II	34
VIg. Resumen del procedimiento experimental	34
VII. Resultados	35
VIIa. Fase I	35
VIIa.1. Resultados histológicos	35
VIIa.2. Densitometría de imágenes digitalizadas	37
VIIb. Fase II	40
VIII. Discusión	42
VIIIa. Resumen y discusión preliminar	42
VIIIb. Relevancia del fenómeno para la investigación en neurociencias	47
VIIIc. Mecanismos neurofisiológicos de la remodelación sináptica	50
Referencias	54

ESTUDIO DE LA REORGANIZACION SINAPTICA DE LAS FIBRAS MUSGOSAS HIPOCAMPALES DE LA RATA TRAS LA EJECUCION DE UNA TAREA ESPACIAL (LABERINTO DE AGUA)

Uno de los mayores retos de las neurociencias hoy en día, es el describir los mecanismos por los cuales el sistema nervioso almacena información por tiempos prolongados. Este problema ha sido abordado desde diversos enfoques entre los que destaca el que relaciona las modificaciones estructurales del sistema nervioso central, en particular de sus circuitos neuronales, con capacidades y funciones específicas de los organismos. Esta característica del sistema nervioso ha sido estudiada desde los aspectos biofísicos, bioquímicos y anatómicos.

I. ANTECEDENTES Y ESQUEMA DEL TRABAJO.

Hace ya más de trescientos años Descartes propuso que la manera por la cual un organismo almacena información es a través de la modificación de las relaciones entre los diferentes componentes de lo que denominaba el sistema maestro de control (Descartes, citado por Lashley, 1950). Los frenólogos en el siglo pasado (Spurzheim, 1825) proponían algo parecido. El cerebro, decían, es como un grupo de músculos: las funciones que más se ejerciten producirán un aumento de tamaño en la región cerebral correspondiente. En ellos estaba ya presente la idea de que el sistema nervioso es capaz de modificarse como consecuencia de la actividad.

Hoy sabemos que el cerebro no crece ni se abulta como los músculos al ser ejercitados. Sin embargo, la idea de que el cerebro se modifica como

consecuencia de la actividad a que es sometido, se ha vuelto fundamental para explicar cómo los organismos almacenan información procedente de la interacción con su medio ambiente.

Uno de los conceptos generalmente utilizados para describir los procesos de modificación del sistema nervioso es el de plasticidad, dada su analogía con los materiales que pueden ser moldeados por la interacción con un agente externo o cambios en las propiedades o características del mismo. En las neurociencias, la plasticidad implica cambios funcionales y/o estructurales en la organización del sistema nervioso debido a alteraciones en la ontogenia del organismo.

Las modificaciones en el cerebro de un organismo pueden afectar la manera por la que un organismo responderá posteriormente ante la estimulación del medio ambiente. Entre los procesos de cambio por los que un organismo modifica la manera en la que responde ante el medio ambiente tras interactuar con el mismo, existe uno, que generalmente se denomina aprendizaje.

El sustrato fisiológico de este fenómeno es el sistema nervioso. Por esta razón, cuando un organismo aprende, se origina actividad neuronal que podría producir modificaciones en el sistema nervioso de dicho organismo. Estas modificaciones le permitirían modificar su respuesta en situaciones posteriores semejantes.

Se han logrado detectar algunas estructuras del cerebro que parecen ser indispensables para la ejecución de tareas que se utilizan como modelos de aprendizaje. El hipocampo es una de éstas. A él está dedicada la primera sección de este trabajo, en la que se hace una descripción anatómica del hipocampo así como un recuento de su participación en los procesos biológicos del aprendizaje.

Las fibras musgosas son un subsistema celular dentro del hipocampo que tiene una participación importante en algunos procesos de aprendizaje. Las características celulares de las fibras musgosas les confieren una importante potencialidad como participantes en los procesos plásticos relacionados con la ejecución de las tareas en las que se ha observado la participación hipocampal. A

este subsistema está dedicada la segunda sección del trabajo.

Una de las características de las fibras musgosas que las hace un candidato atractivo para estudiar los fenómenos plásticos relacionados al aprendizaje, es el hecho de que las fibras musgosas son altamente susceptibles de experimentar modificaciones de tipo anatómico, es decir, aquellas que implican cambios en la disposición física de las conexiones entre las neuronas. El término comúnmente utilizado para describir este tipo de cambios es el de reorganización sináptica.

Los cambios de este tipo tienen especial relevancia para el estudio del fenómeno del aprendizaje fundamentalmente debido a su durabilidad y resistencia a la actividad subsecuente. Por esta razón, en la tercera sección del trabajo, se exponen algunos ejemplos de cómo la actividad es capaz de modificar la conformación anatómica del sistema nervioso central (SNC), en especial el patrón sináptico del subsistema de las fibras musgosas.

Posterior a esta revisión, se plantean las hipótesis que guiaron la presente investigación, se describen los resultados que produjo, y se discuten y evalúan dichos resultados en torno a la literatura revisada así como las implicaciones para las neurociencias.

II. EL HIPOCAMPO: UNA ESTRUCTURA RELACIONADA CON EL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA.

La relación de los procesos de aprendizaje y memoria con la actividad del sistema nervioso central, ha sido evidenciada al descubrirse que la integridad de varias regiones del cerebro es de fundamental importancia para la adecuada ejecución de tareas que involucran estos procesos. Una de las regiones más ampliamente estudiadas en este sentido es el hipocampo. Esta estructura juega un papel crucial en las funciones de memoria y aprendizaje, como lo ha demostrado el efecto adverso que tiene tanto en humanos como en monos y

este subsistema está dedicada la segunda sección del trabajo.

Una de las características de las fibras musgosas que las hace un candidato atractivo para estudiar los fenómenos plásticos relacionados al aprendizaje, es el hecho de que las fibras musgosas son altamente susceptibles de experimentar modificaciones de tipo anatómico, es decir, aquellas que implican cambios en la disposición física de las conexiones entre las neuronas. El término comúnmente utilizado para describir este tipo de cambios es el de reorganización sináptica.

Los cambios de este tipo tienen especial relevancia para el estudio del fenómeno del aprendizaje fundamentalmente debido a su durabilidad y resistencia a la actividad subsecuente. Por esta razón, en la tercera sección del trabajo, se exponen algunos ejemplos de cómo la actividad es capaz de modificar la conformación anatómica del sistema nervioso central (SNC), en especial el patrón sináptico del subsistema de las fibras musgosas.

Posterior a esta revisión, se plantean las hipótesis que guiaron la presente investigación, se describen los resultados que produjo, y se discuten y evalúan dichos resultados en torno a la literatura revisada así como las implicaciones para las neurociencias.

II. EL HIPOCAMPO: UNA ESTRUCTURA RELACIONADA CON EL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA.

La relación de los procesos de aprendizaje y memoria con la actividad del sistema nervioso central, ha sido evidenciada al descubrirse que la integridad de varias regiones del cerebro es de fundamental importancia para la adecuada ejecución de tareas que involucran estos procesos. Una de las regiones más ampliamente estudiadas en este sentido es el hipocampo. Esta estructura juega un papel crucial en las funciones de memoria y aprendizaje, como lo ha demostrado el efecto adverso que tiene tanto en humanos como en monos y

ratas, la lesión o alteración del hipocampo (Squire, 1992).

Ila. Consideraciones anatómicas.

El hipocampo es una estructura cortical filogenéticamente antigua localizada en los hemisferios cerebrales, bajo la neocorteza. Tiene una estructura tridimensional compleja, en forma de una C abierta con un extremo en la región septal dorsal en las regiones mediales del cerebro, y otro en las partes laterales y profundas del lóbulo temporal (fig. 1).

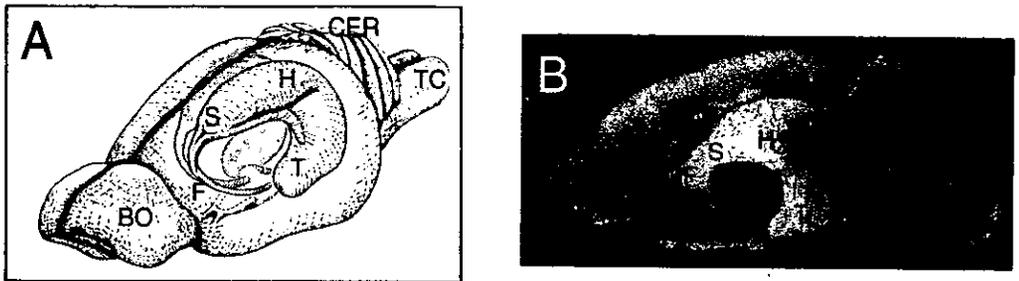


Fig 1. Visión esquemática del hipocampo mostrando su localización en el hemisferio cerebral (A) y fotografía del hipocampo con el hemisferio cerebral removido (B). H: hipocampo; S: polo septal; T: polo temporal; BO: bulbo olfatorio; TC: tallo cerebral; CER: cerebelo; F: fórnix; CC: cuerpo calloso. Modificado de Amaral y Witter (A; 1995) y de Gaarskjaer (B; 1986).

La organización interna del hipocampo es laminar, se encuentra bien definida y es fácilmente observable. Ha sido generalmente subdividido por los anatomistas en dos regiones principales: el giro dentado, y los campos de Ammón (CA1-3) (fig. 2) (Amaral y Witter, 1995). Las neuronas características del giro dentado son las llamadas células granulares. En la región de los campos de Ammón el tipo celular característico es el de las células piramidales.

La exploración histológica sistemática de la región de los campos de Ammón ha permitido observar la conformación laminar que posee esta estructura. Una característica conspicua es que las neuronas piramidales se encuentran organizadas en una capa que recorre toda la región. Esto divide a la región en tres subregiones laminares: la zona suprapiramidal, llamada *stratum radiatum*, la

zona infrapiramidal, llamada *stratum oriens*, y la zona de los somas neuronales, llamada *stratum pyramidale*. Dada la orientación de las células piramidales, el *stratum radiatum* está conformado por las dendritas apicales de estas neuronas mientras que el *stratum oriens* lo ocupan las dendritas basales. En la región CA3, existe una cuarta subregión laminar, llamada *stratum lucidum*, que incluye la zona proximal de las dendritas apicales de las neuronas piramidales la cual se encuentra ocupada por las terminales de las fibras musgosas (Amaral y Witter, 1995).

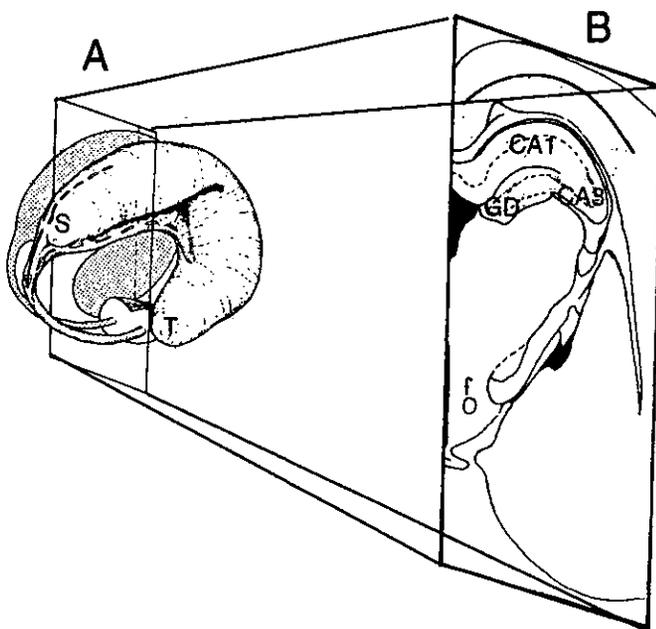


Fig. 2. Anatomía básica del hipocampo. A. El hipocampo izquierdo disecado y plano de un corte coronal. S: polo septal; T: polo temporal. B. Corte coronal del hipocampo en el plano mostrado en A, cerca del polo septal; GD: giro dentado; CA1-3: Campos de Ammón; f: fórnix. Modificado de Amaral y Witter (1995).

En el caso del giro dentado, los somas neuronales de las células granulares se encuentran apiñados en la zona limítrofe con la región de los campos de Ammón, en una capa que se conoce con el nombre de capa granular. La zona ocupada por las dendritas apicales de estas células, la cual se extiende

hasta el límite exterior del giro dentado (tomando como límite interior los campos de Ammón), se conoce con el nombre de capa molecular. Esta capa se subdivide generalmente en externa e interna.

Las células de estas dos grandes regiones se conectan entre sí de la siguiente forma: los axones de las células granulares del giro dentado, denominados en conjunto fibras musgosas, forman una proyección compacta que hace sinapsis con las células piramidales del área CA3; a su vez, estas células proyectan sus axones hacia las células piramidales del área CA1 por el haz denominado colaterales de Schaffer. Estos dos contactos, junto con la sinapsis corteza entorrinal-giro dentado, constituyen el llamado circuito trisináptico del hipocampo, el cual forma la base de las conexiones dentro de éste (fig 3.) (Teyler, 1991).

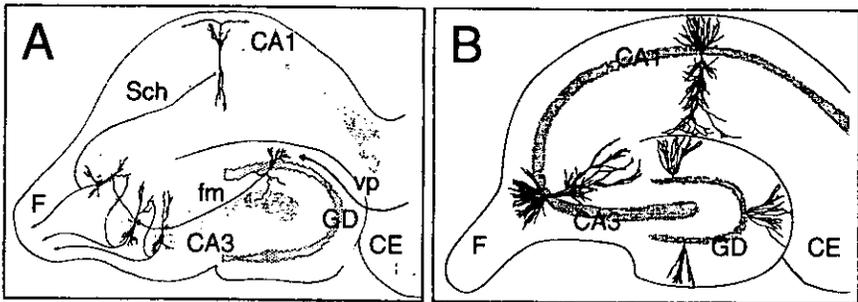


Fig 3. A. Corte coronal del hipocampo mostrando el circuito trisináptico. B. Corte coronal del hipocampo mostrando la arborización dendrítica de las neuronas típicas de las principales regiones del hipocampo. F: fórmix; GD: Giro Dentado; fm: fibras musgosas; vp: vía perforante; CE: Corteza entorrinal; CA1, 3: Campos de Ammón; Sch: Colaterales de Schaffer. Modificado de Ben-Ari y Represa (A; 1990) y de Amaral y Witter (B; 1995).

IIb. El hipocampo y los procesos de aprendizaje espacial.

La existencia de deficiencias en la capacidad de recordar en pacientes con lesión en la región temporal del cerebro, constituyó una de las primeras evidencias de la participación del hipocampo en los procesos de memoria y aprendizaje. El paciente H. M. (Milner et al., 1968), por ejemplo, constituye uno de los primeros casos de lesión a la región temporal del cerebro que se haya

documentado sistemáticamente. El paciente H. M. sufrió la extirpación bilateral de los lóbulos temporales debido a la presencia de epilepsia intratable en esa región del cerebro. Como resultado, H.M. se volvió amnésico; es decir, perdió la memoria.

Este caso, junto con otros que se estudiaron a raíz de éste con el propósito de elucidar el papel que tienen en los procesos de recuerdo las formaciones del lóbulo temporal que incluyen al hipocampo, dio origen a la búsqueda de un modelo animal que pudiese replicar los hallazgos en humanos con el fin de buscar explicaciones a los mecanismos biológicos de la memoria. Los modelos animales más utilizados para este fin han sido ratas, ratones y monos de diversas especies (Squire, 1992; Squire y Zola-Morgan, 1991).

En las ratas y los ratones la participación del hipocampo en los procesos de aprendizaje y memoria ha sido ampliamente documentada en trabajos donde se ha lesionado esta estructura y se han observado los efectos adversos de las lesiones sobre la ejecución de diversos tipos de tareas.

Los laberintos, entre los que se cuentan el laberinto T, el laberinto radial y el laberinto de agua, son las tareas de tipo espacial más comúnmente utilizadas para estudiar los procesos de aprendizaje espacial en las ratas (fig 4.).

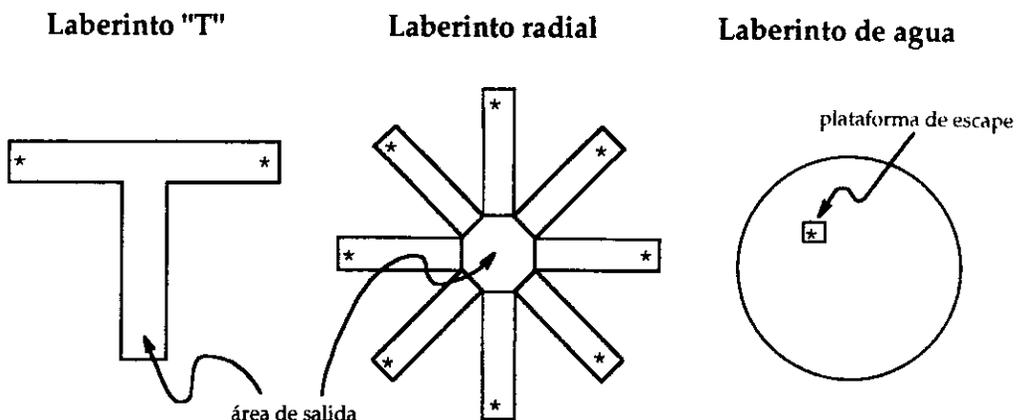


Fig. 4. Tareas de aprendizaje espacial. A. Laberinto T. B. Laberinto radial. C. Laberinto de agua.

El aprendizaje en este tipo de tareas espaciales se ve especialmente afectado por lesiones al hipocampo (Olsen et al., 1994; Volpe et al., 1992; Aggleton et al., 1992, 1989; Winocur y Moscovitch, 1990; Auer et al., 1989; Emerich y Walsh, 1989; Olton y Feustle, 1981; Becker et al., 1980; Olton y Papas, 1979). Estas observaciones apuntan al hecho de que el hipocampo es una estructura de crucial importancia para la ejecución de tareas de tipo espacial. Sin embargo, más recientemente, han sido detectados efectos adversos en tareas que requieren discriminación temporal (Meck, 1988; Olton et al., 1987; Meck et al., 1984), reconocimiento de objetos (Wood et al., 1993; Aggleton et al., 1989), y discriminación de estímulos compuestos (Whishaw y Tomie, 1991; Sutherland y McDonald, 1990; Rudy y Sutherland, 1989).

Todos estos estudios han hecho posible el establecer una relación estrecha entre la utilización y/o el almacenamiento de información sobre todo de tipo espacial, y la integridad del hipocampo.

IIc. La actividad eléctrica en el hipocampo.

Debido a que los trabajos con lesiones en el hipocampo han mostrado que la integridad de éste es de fundamental importancia en la ejecución de tareas, sobre todo de tipo espacial, las investigaciones en torno a los mecanismos que intervienen en el procesamiento y el almacenamiento de información necesarios para la adecuada ejecución de las tareas, se han orientado hacia la elucidación de elementos celulares y/o sinápticos involucrados en estos procesos.

Bliss y Lomo (1973) encontraron que breves trenes de alta frecuencia aplicados a las aferentes excitatorias del hipocampo causaban un incremento en la fortaleza de la transmisión sináptica que podía durar por días y aún semanas en animales intactos. Desde su descubrimiento, esta potenciación a largo plazo (PLP) de la transmisión sináptica excitatoria del hipocampo, se ha convertido en uno de los modelos experimentales primarios para examinar los mecanismos sinápticos del almacenamiento de la información. En el hipocampo ha logrado inducirse PLP en varias vías como la vía perforante (Bliss y Lomo, 1973; Roberts

et al., 1997; Doyere et al., 1997), las colaterales de Schaffer (Wang y Steltzer, 1996; Debanne et al., 1996; Abraham y Hugett, 1997) y las fibras musgosas (Derrick et al., 1991; Nicoll y Malenka, 1995; Escobar et al., 1997). Asimismo, ha logrado inducirse PLP en varias regiones de la neocorteza (Artola y Singer, 1990; Tsumoto, 1992; Bear y Kirkwood, 1993; Escobar et al., 1998).

La relación de este fenómeno con los procesos de aprendizaje ha sido bastante estudiada en el hipocampo y en otras regiones del SNC (Martínez y Derrick, 1996). Un ejemplo al respecto es el estudio de Morris (1989), donde el bloqueo de la transmisión sináptica dependiente de receptores NMDA en ratas produjo deficiencia en el aprendizaje de una tarea espacial (el laberinto de agua) y en la inducción de PLP en sus hipocampos.

Otro nivel de estudio que intenta relacionar la actividad eléctrica del hipocampo con el aprendizaje y la memoria es el que investiga la actividad eléctrica de las neuronas en el organismo vivo, completo, registrándolas directamente y observando la relación que guardan con la conducta del organismo. Esta clase de estudios ha permitido observar la actividad eléctrica global del hipocampo cuando el organismo completo se encuentra realizando alguna actividad exploratoria. La manera de proceder en este tipo de estudios, generalmente consiste en la implantación de electrodos de registro en alguna región del hipocampo de forma tal que el animal pueda moverse libremente mientras se registra la actividad neuronal.

El registro con más de un electrodo, generalmente dos o cuatro, acoplado a un sistema digital de procesamiento de información, ha permitido hacer registros de campo de la actividad individual de muchas neuronas a la vez. (O'Keefe, 1976; Speakman y O'Keefe, 1987).

Un hallazgo sorprendente de este tipo de estudios ha sido la correspondencia que exhiben los patrones determinados de actividad neuronal con la posición del animal en una localidad espacial determinada. Se ha podido observar, por ejemplo, que los patrones de actividad de las neuronas en animales en libre movimiento en un espacio cerrado, corresponden a las diferentes

localidades en dicho espacio, al parecer, mapeándolo (fig. 5). Los patrones de actividad constituyen un mapa del lugar al punto en que los investigadores pueden decir en qué lugar está el animal con sólo ver el patrón de disparo registrado (Burgess y O'Keefe, 1996).

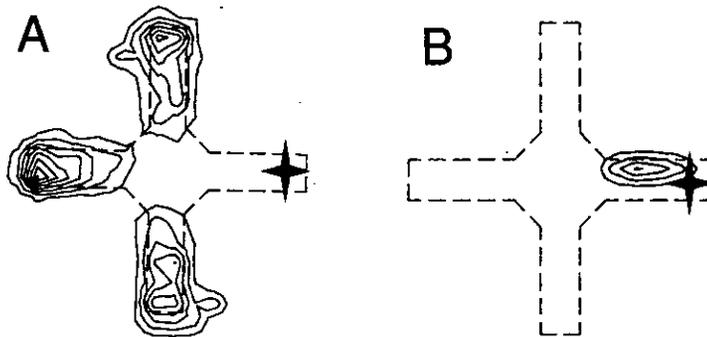


Fig. 5. Laberintos de cuatro brazos donde se superpone el registro de neuronas individuales (curvas concéntricas) a la localidad espacial donde se encuentra el animal. A. Registros correspondientes a brazos no-blanco. B. Registro correspondiente al brazo blanco. De Burgess y O'Keefe (1996). Estrella: blanco.

Este tipo de observaciones, aunadas a la presencia dentro del hipocampo del fenómeno de la PLP que muestra similitudes al proceso de aprendizaje, permiten afirmar el papel crucial que tiene el hipocampo en el procesamiento de la información necesaria para ejecutar tareas de tipo espacial. Los efectos adversos que tienen las lesiones en esta estructura sobre este tipo de tareas apoya aún mas este hecho. De esta forma podemos concluir que el hipocampo es una estructura nerviosa que tiene una especialización en el procesamiento de información de tipo espacial.

III. LAS FIBRAS MUSGOSAS.

La participación diferencial de subsistemas celulares dentro del hipocampo en los procesos biológicos del aprendizaje y la memoria ha sido una vía para

localidades en dicho espacio, al parecer, mapeándolo (fig. 5). Los patrones de actividad constituyen un mapa del lugar al punto en que los investigadores pueden decir en qué lugar está el animal con sólo ver el patrón de disparo registrado (Burgess y O'Keefe, 1996).

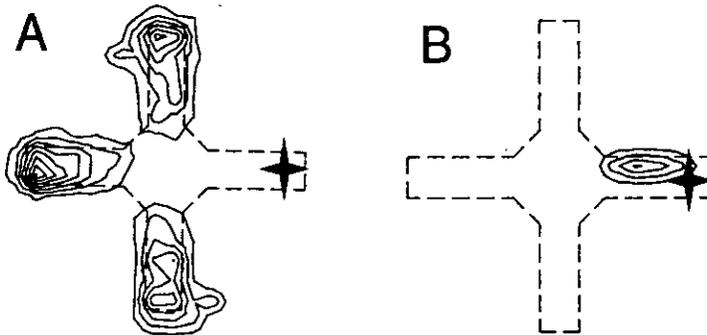


Fig. 5. Laberintos de cuatro brazos donde se superpone el registro de neuronas individuales (curvas concéntricas) a la localidad espacial donde se encuentra el animal. A. Registros correspondientes a brazos no-blanco. B. Registro correspondiente al brazo blanco. De Burgess y O'Keefe (1996). Estrella: blanco.

Este tipo de observaciones, aunadas a la presencia dentro del hipocampo del fenómeno de la PLP que muestra similitudes al proceso de aprendizaje, permiten afirmar el papel crucial que tiene el hipocampo en el procesamiento de la información necesaria para ejecutar tareas de tipo espacial. Los efectos adversos que tienen las lesiones en esta estructura sobre este tipo de tareas apoya aún mas este hecho. De esta forma podemos concluir que el hipocampo es una estructura nerviosa que tiene una especialización en el procesamiento de información de tipo espacial.

III. LAS FIBRAS MUSGOSAS.

La participación diferencial de subsistemas celulares dentro del hipocampo en los procesos biológicos del aprendizaje y la memoria ha sido una vía para

adentrarse más en la elucidación de los mecanismos a nivel celular de dichos procesos.

Uno de los subsistemas del hipocampo que ha sido explorado intensivamente en este sentido es el de las fibras musgosas. Este subsistema es bastante accesible al estudio histológico, electrofisiológico y bioquímico debido principalmente al gran tamaño relativo de sus componentes, y como consecuencia de la estructura laminar del hipocampo.

Illa. Consideraciones anatómicas de las fibras musgosas.

Las fibras musgosas están conformadas por los axones de las células granulares del giro dentado. Constituyen una de las tres secciones del circuito trisináptico del hipocampo, siendo la proyección del giro dentado a la región CA3, donde hacen sinapsis con las células piramidales. Por esta razón, participan en la transmisión de información que pasa entre estas dos regiones.

Las células granulares reciben aferencias masivas desde la corteza entorrinal, la cual llega a los dos tercios externos de sus dendritas; en su tercio interno reciben una proyección del hilus ipsi y contralateral. De su polo somático basal, emerge un axón que luego tiene varias ramificaciones (se han observado alrededor de seis) en el hilus. Estos axones se reúnen en el hilus y forman la proyección compacta hacia la región CA3 que se denomina fibras musgosas (Gaarskjaer, 1986).

La proyección de las fibras musgosas, se restringe a la región CA3 en las ratas y ratones. Se le ha dividido en dos secciones: la principal, denominada suprapiramidal, hace sinapsis *en passant* en la zona proximal de las dendritas apicales de las células piramidales en CA3; la sección secundaria, denominada infrapiramidal, hace sinapsis del mismo tipo que la anterior pero en las partes proximales de las dendritas basales de las células piramidales de CA3. Esta segunda sección se extiende normalmente sólo desde el hilus hasta el primer cuarto de la distancia entre éste y la terminación del área CA3 en las ratas de la cepa Wistar (Schwegler et al., 1993) (fig. 6).

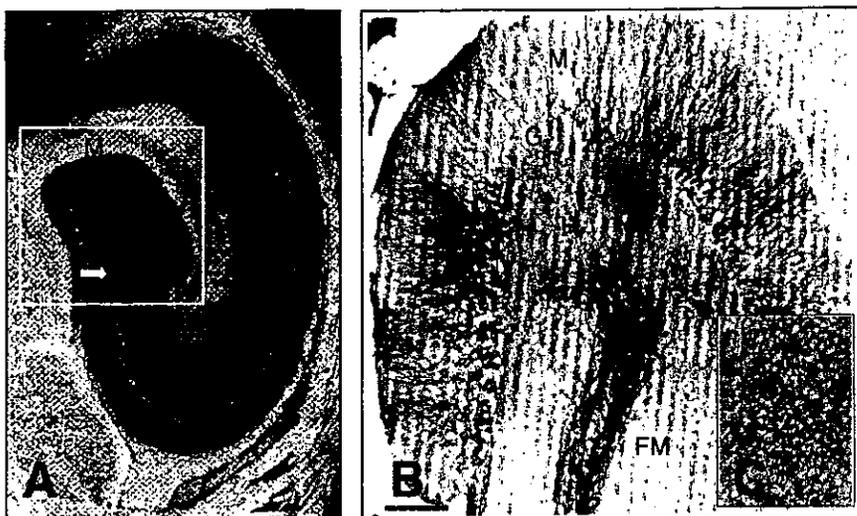


Fig. 6. A. Tinción de Timm de un corte horizontal del hipocampo de una rata que muestra en negro oscuro el sistema de las fibras musgosas. Note la proyección musgosa infrapirramidal (flechas blancas). B. Ampliación del área encuadrada en A. de una preparación con el trazador biocitina que muestra la región del giro dentado y el hilus del hipocampo, mostrando la arborización dendrítica de las células granulares y, hacia la parte inferior de la foto, la zona donde comienzan las fibras musgosas, pudiéndose observar los haces de axones que parten hacia la región CA3. C. Corte transversal de las fibras musgosas que muestran la gran cantidad de axones que constituyen este haz de fibras. FM: fibras musgosas; H: Hilus; G y M: capas granular y molecular del giro dentado, respectivamente; CE: corteza entorrinal R: *stratum radiatum*; L: *stratum lucidum*; P: *stratum pyramidale*; O: *stratum oriens*. Modificado de Gaarskjaer (A y C; 1986). De Okazaki et al. (B; 1995).

Las terminales axónicas de las fibras musgosas están conformadas por botones sinápticos gigantes (5 a 10 micras en el eje más grande), con múltiples dobleces y varicosidades. Estos botones se encuentran invaginados por excrecencias y espinas gigantes de las células piramidales, procesos a los que típicamente envuelven completamente formando grandes complejos sinápticos. Por esto, cada botón sináptico hace múltiples sinapsis asimétricas con las espinas dendríticas (fig. 7) (Gaarskjaer, 1986).

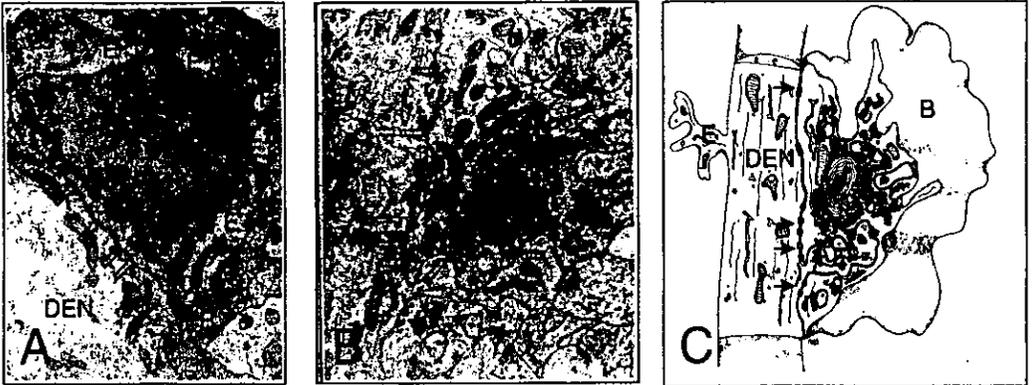


Fig. 7. A. y B. Micrografías electrónicas de botones musgosos típicos (B) estableciendo contactos sinápticos (flechas) con una dendrita. Nótese la gran cantidad de vesículas sinápticas dentro del botón, y la interdigitación de espinas dendríticas (E) con el botón (B). C. Diagrama del botón en B. haciendo notar la estructura tridimensional de la dendrita y el botón sináptico. De Gaarskjaer (A; 1986) y de Amaral y Dent (B y C; 1981).

Este tipo de morfología ultraestructural es característico de las terminales de las fibras musgosas y se ha encontrado que se conserva en muchas especies de mamífero, tales como el conejo, el gato, el cuyo, además de las ratas y ratones (Gaarskjaer, 1986). La morfología de la postsinapsis y la morfología compleja de los botones terminales, aunado al hecho de que cada fibra presenta muchos botones, haciendo sinapsis *en passant*, es lo que le da la apariencia "musgosa" a estas fibras, y de ahí se deriva su nombre (fig. 8).



Fig. 8. Célula piramidal de CA3 donde se observan varicosidades (flechas) en los contactos sinápticos de botones musgosos. Microfotografía de una tinción de Golgi. Amaral y Dent (1981).

IIIb. Consideraciones electrofisiológicas y bioquímicas de las fibras musgosas.

Las fibras musgosas son una proyección fundamentalmente excitatoria, que utiliza principalmente glutamato en la neurotransmisión pero también emplea péptidos opioides. Algunas de las particularidades de la actividad electrofisiológica de las fibras musgosas parecen recaer sobre los péptidos opioides, dado que la acción del glutamato es semejante al de otros lugares donde éste funciona como neurotransmisor.

Los péptidos opioides de las fibras musgosas se pueden agrupar de modo general en dos: las prodinorfinas y las proencefalinas. Estos dos tipos de moléculas se derivan cada una de un gen distinto, cuyo producto es luego dividido para dar los péptidos activos en la neurotransmisión. Todas las células granulares expresan constitutivamente el gen prodinorfina. Además, un 15% de ellas expresan el gen proencefalina (Morris y Johnston, 1995).

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

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

los procesos plásticos de las fibras musgosas, lo que parece ser el caso.

Eléctricamente, esta proyección responde a la estimulación directa como otras en el SNC. Sin embargo, posee características especiales en su comportamiento ante algunos tipos de estimulación eléctrica como la PLP. Al estudiar la inducción de PLP en las fibras musgosas, se han encontrado dos puntos fundamentales en que el proceso de inducción difiere con respecto al de otras sinapsis donde se ha logrado inducir PLP, como la vía perforante o las colaterales de Schaffer. Por un lado, no parece depender de la activación de la célula postsináptica para su inducción. (Nicoll y Malenka [1995] llegan a opinar que es de naturaleza enteramente presináptica.) Por otro lado, no depende de la activación de receptores NMDA (Nicoll y Malenka, 1995). Al parecer el elemento crucial en la inducción de PLP en estas fibras es la activación de receptores para péptidos opioides (Derrick et al., 1991), concretamente el receptor de tipo μ (Derrick et al., 1992). Aún más, se ha demostrado que la activación del receptor de tipo κ , impide la inducción de PLP (Terman et al., 1994).

IIIc. Las fibras musgosas y los procesos de aprendizaje y memoria.

La relación de la actividad en las fibras musgosas y los procesos de aprendizaje y memoria, se ha realizado en varios sentidos. Uno de ellos es la correlación entre el aprendizaje de una tarea de aprendizaje espacial y la extensión del campo terminal o de proyección de las fibras musgosas. En este sentido, se ha realizado un procedimiento de selección genético en ratones, procedimiento que producía diferencias significativas en el tamaño del campo terminal en diferentes grupos. Y se encontró que, en el laberinto de agua, la extensión de la porción infrapiramidal de la proyección de las fibras musgosas se correlaciona negativamente con la latencia de escape en el laberinto de agua (Lipp et al., 1989) y positivamente con el aprendizaje de una nueva localidad de escape en el laberinto de agua y con un mayor tiempo de búsqueda de la plataforma en la prueba sin plataforma en la misma tarea (Bernasconi-Guastalla et al., 1994). En el caso del campo terminal total de las fibras musgosas, se ha

encontrado una correlación negativa con la latencia de escape (tiempo de llegada a la plataforma) en el laberinto de agua (Wahlsten et al., 1991).

La participación de las fibras musgosas y su particular sistema de neurotransmisión en los procesos plásticos en el hipocampo, ha sido evidenciada al mostrarse que tanto la activación de las aferentes al giro dentado como la administración de agonistas a receptores NMDA en las células granulares del giro dentado, promueven la expresión de ARN mensajero del gen proencefalina y la supresión de la expresión constitutiva del gen prodinorfina (Johnston y Morris, 1994). El producto del gen proencefalina, como se mencionó antes, da origen a péptidos afines a los receptores μ y δ , los cuales tienen un efecto excitador sobre las células piramidales de CA3. Este efecto de dominó en la facilitación de transmisión de información de una sinapsis activada directamente (vía perforante-giro dentado) a una no activada directamente (fibras musgosas-células piramidales de CA3), permitiría que la potenciación de una sinapsis pudiera activar la sinapsis siguiente en el mismo sistema de transmisión de información, facilitando el paso global de información en ese sistema (el circuito trisináptico del hipocampo; Morris y Johnston, 1995). Esto muestra que las células granulares tienen elementos a nivel celular que las convierte en un candidato atractivo para explicar parte de la capacidad plástica del hipocampo.

Una tercera área donde se ha encontrado una relación de las fibras musgosas con los procesos de aprendizaje y memoria, es observando la relación de su actividad eléctrica con tareas de aprendizaje. La estimulación de baja frecuencia de las fibras musgosas, por ejemplo, afecta adversamente el aprendizaje espacial (Collier y Routtenberg, 1984; Collier et al., 1987). Por otro lado, se ha encontrado que el avance en el aprendizaje de una tarea espacial, se correlaciona positivamente con la potenciación en las fibras musgosas (Mitsuno et al., 1994). Esta aparente contradicción de efectos parece tener una explicación a nivel de los neurotransmisores: la actividad basal (aumentada por la estimulación de baja frecuencia) de las fibras musgosas, libera dinorfinas, que son inhibitoras de la actividad de las células piramidales de CA3, mientras que la potenciación

libera encefalinas, cuyo efecto es excitador (Morris y Johnston, 1995).

IV. REORGANIZACION SINAPTICA EN EL SNC.

El hipocampo ha sido, entonces, identificado como pieza fundamental en los procesos de aprendizaje y memoria. Asimismo, es una región que exhibe características electrofisiológicas como la PLP que hacen pensar que es su capacidad plástica la que le permite participar en dichos procesos. Las fibras musgosas, como subregión del hipocampo, tienen características especiales que la hacen útil para la evaluación de la plasticidad en el SNC y su relación con los procesos de aprendizaje y memoria.

Existen tres razones fundamentales por las que esta proyección ha sido estudiada extensamente en relación a las modificaciones estructurales que sufre.

La primera es consecuencia de la anatomía laminar del hipocampo (descrita anteriormente), lo cual permite que cualquier subregión que pueda ser marcada de forma aislada, sea fácilmente observable dado el ordenamiento altamente delimitado que existe entre las diferentes subregiones o grupos celulares del hipocampo en las preparaciones disponibles.

La segunda razón, es que sus botones sinápticos terminales son muy grandes y numerosos, fácilmente visibles con la utilización de la técnica argéntica de Timm, que aprovecha las grandes cantidades de zinc que contienen. Además, son fácilmente identificables en el microscopio electrónico, así como con técnicas de trazado como la biocitina o el amarillo de lucifer inyectados por iontoforesis, o técnicas inmunocitoquímicas para péptidos opioides.

La tercera es la susceptibilidad que tienen las fibras musgosas frente a los cambios en la actividad eléctrica a que son sometidos en diversas preparaciones experimentales, en especial aquellas relacionadas a la actividad convulsiva. Esta susceptibilidad frente a manipulaciones que afectan su actividad las hace muy útiles como modelo de plasticidad en el sistema nervioso.

libera encefalinas, cuyo efecto es excitador (Morris y Johnston, 1995).

IV. REORGANIZACION SINAPTICA EN EL SNC.

El hipocampo ha sido, entonces, identificado como pieza fundamental en los procesos de aprendizaje y memoria. Asimismo, es una región que exhibe características electrofisiológicas como la PLP que hacen pensar que es su capacidad plástica la que le permite participar en dichos procesos. Las fibras musgosas, como subregión del hipocampo, tienen características especiales que la hacen útil para la evaluación de la plasticidad en el SNC y su relación con los procesos de aprendizaje y memoria.

Existen tres razones fundamentales por las que esta proyección ha sido estudiada extensamente en relación a las modificaciones estructurales que sufre.

La primera es consecuencia de la anatomía laminar del hipocampo (descrita anteriormente), lo cual permite que cualquier subregión que pueda ser marcada de forma aislada, sea fácilmente observable dado el ordenamiento altamente delimitado que existe entre las diferentes subregiones o grupos celulares del hipocampo en las preparaciones disponibles.

La segunda razón, es que sus botones sinápticos terminales son muy grandes y numerosos, fácilmente visibles con la utilización de la técnica argéntica de Timm, que aprovecha las grandes cantidades de zinc que contienen. Además, son fácilmente identificables en el microscopio electrónico, así como con técnicas de trazado como la biocitina o el amarillo de lucifer inyectados por iontoforesis, o técnicas inmunocitoquímicas para péptidos opioides.

La tercera es la susceptibilidad que tienen las fibras musgosas frente a los cambios en la actividad eléctrica a que son sometidos en diversas preparaciones experimentales, en especial aquellas relacionadas a la actividad convulsiva. Esta susceptibilidad frente a manipulaciones que afectan su actividad las hace muy útiles como modelo de plasticidad en el sistema nervioso.

Por estas razones, se han buscado intensamente las condiciones en las que las fibras musgosas cambian sus patrones sinápticos, con el propósito de elucidar los mecanismos desde el nivel celular hasta el anatómico, que son utilizados para la modificación de la conformación sináptica. Este tipo de explicaciones tienen el objetivo final de lograr describir adecuadamente cómo el sistema nervioso almacena información por medio de la modificación de sus conexiones, no sólo de tipo espacial y localizada en el hipocampo, sino cualquier clase de información y en cualquier parte del cerebro.

IVa. Reorganización sináptica de las fibras musgosas durante la ontogenia.

La mayoría de las células granulares, y por ende, de las fibras musgosas, se forman en las ratas después del nacimiento, durante los primeros 28 días de vida postnatal (Gaarskjaer, 1986). Este proceso de crecimiento sufre alteraciones ante la disminución en la disponibilidad de nutrientes, principalmente proteínas. En este sentido, se ha encontrado que la desnutrición prenatal disminuye la extensión y el volumen del campo terminal de las fibras musgosas (Cintra et al., 1997). En las células piramidales de CA3, el mismo tipo de desnutrición reduce la ramificación dendrítica así como la densidad de espinas dendríticas (Díaz-Cintra et al., 1994); efectos similares se observan en el giro dentado (Cintra et al., 1990).

Los efectos más notorios de la desnutrición postnatal en animales jóvenes (Bedi, 1991; De Bassio et al., 1994) como en adultos (Andrade et al., 1993; 1995), radican en la disminución del número de células granulares en el giro dentado, efecto que se mantiene a pesar de la rehabilitación nutricional posterior. La disminución definitiva en el número de células granulares en el giro dentado en los animales adultos provoca, sin embargo, cambios plásticos importantes en las fibras musgosas ante la rehabilitación nutricional, los cuales permiten recuperar el área de contacto sináptico inicial entre las fibras musgosas y las células piramidales del área CA3 (Andrade et al., 1996) (fig. 9).



Fig. 9. Modificaciones estructurales de las fibras musgosas en ratas sometidas a rehabilitación nutricional tras periodos prolongados de desnutrición (flecha). GD: giro dentado; FM: fibras musgosas. CA1: Campo de Ammón 1. De Andrade et al. (1995).

IVb. Efectos de los ambientes enriquecidos sobre el SNC.

Es conocido que durante los periodos postnatales tempranos, el sistema nervioso aún se encuentra generando gran cantidad de neuronas y que está en activo proceso de organización sináptica. Asimismo, se sabe que algunos de estos procesos, son dependientes de la estimulación sensorial que recibe el organismo (Killakey et al., 1995). Debido a esto, se ha explorado el efecto que tiene la estimulación diferencial sobre la conformación del SNC durante este periodo.

El crecer en un ambiente rico en estimulación externa, por ejemplo, viviendo en compañía de otros congéneres, siendo expuesto regularmente a ambientes nuevos (e.g. un espacio abierto con objetos nuevos o colocados en posiciones nuevas), o siendo manipulado frecuentemente por parte del experimentador, tiene efectos sobre el SNC. Estos efectos van desde cambios microestructurales (i.e. número de ramas o espinas dendríticas, e.g. Bryan y Riesen, 1989) hasta el nivel morfológico grueso (e.g. Diamond et al., 1967).

A nivel morfológico grueso, se han observado aumentos en el grosor de algunas secciones de la neocorteza (Diamond et al., 1967) y en la densidad sináptica de todo el cerebro (Saito et al., 1994). Este aumento en la densidad sináptica también se encontró localmente en la corteza visual de ratas (Turner y Greenough, 1985) concomitante a un aumento en la densidad neuronal. Observaciones más finas han revelado incrementos en el número de ramas

dendríticas por neurona en la corteza visual en ratas (Volkmar y Greenough, 1972), o en la corteza visual, somatosensorial y motora en monos (Bryan y Riesen, 1989).

En el hipocampo se han encontrado aumentos en la cantidad de ramas dendríticas de las células granulares (Fiala et al., 1978), así como en el número de células gliales y el grosor del giro dentado en general (Walsh et al., 1969). Recientemente, se ha observado que la estimulación enriquecida a edades tempranas temprana provoca un aumento en la tasa de producción de células granulares, en el número total de células granulares (alrededor del 15%), y, confirmando los hallazgos anteriores, aumento en la cantidad de células gliales en el giro dentado así como en el grosor de la misma región (Kempermann et al., 1997). Este tipo de situaciones experimentales pareciera no originar, de manera directa, modificaciones en el campo terminal de las fibras musgosas.

A nivel bioquímico se han observado aumentos en la sensibilidad del sistema beta-adrenérgico neocortical e hipocampal a la estimulación (Escorihuela et al., 1995), mayor actividad de la proteína cinasa C en el hipocampo (Paylor, et al., 1992), así como incrementos en la expresión del ARN mensajero para BDNF (brain-derived neurotrophic factor, un factor trófico neuronal; Falkenberg et al., 1992) también en el hipocampo. En el aspecto conductual también se han identificado mejorías en la memoria (Escorihuela et al., 1995), disminución de la neofobia (miedo a objetos nuevos), mayor actividad y mejor aprendizaje (Bors y Forrin, 1996; Lasalle et al., 1991) en tareas de campo abierto, mejor ejecución en el laberinto de agua de Morris (Kempermann et al., 1997; Falkenberg et al., 1992; Paylor et al., 1992) y menor tiempo para el aprendizaje de una tarea de alternancia espacial diferida (Mogensen, 1991).

Esto muestra en conjunto que el SNC puede modificarse de manera activo-dependiente donde la actividad es resultado de la estimulación sensorial externa a que es sometido el organismo, lo cual tiene, a su vez, efectos ulteriores sobre la conducta.

IVc. La actividad eléctrica y la reorganización sináptica en el SNC.

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

Sin embargo, dado el número de conexiones que una neurona puede tener (del orden de 40,000 en neuronas piramidales corticales humanas; Cragg, 1975), y el número de neuronas en un cerebro de mamífero adulto (del orden de 10^{11} en el cerebro humano), es evidente la complejidad de las redes resultantes, con millones de nodos y conexiones. De ahí la dificultad de relacionar un proceso de aprendizaje tanto con la actividad eléctrica específica del mismo, como con las modificaciones estructurales en la red que resultan de éste y que presumiblemente lo mantienen.

Se conocen, no obstante, algunas características que relacionan la actividad en una parte del cerebro con modificaciones en esa zona. Por ejemplo, se conocen las ventanas temporales en que un "paquete" de información relacionado a un aprendizaje específico está aún en su fase "eléctrica" (cuando está presente en la actividad eléctrica de la red) y cuando ya se encuentra "grabado" en la arquitectura de la red (es decir, cuando ya ha habido modificaciones sinápticas). Dada la labilidad de la fase "eléctrica", al someter a un animal a choques electroconvulsivos un cierto tiempo (normalmente menos de 30 min) después de que aprendió una tarea, éste, al recuperarse de la convulsión, no recuerda la tarea; sin embargo, si las convulsiones suceden en un lapso de tiempo mayor al anterior (e.g. unas horas después), el animal recuerda perfectamente la tarea (e.g. Buresova y Bures, 1979). Esto ha hecho pensar que las modificaciones en el SNC que permitían este almacenamiento no lábil de la información, serían de tipo estructural, i.e. de los patrones sinápticos, los cuales serían resultado de la actividad eléctrica inicial suscitada por la estimulación

(Weiler et al., 1995). Se piensa que este tipo de modificaciones debe ser resistente a la actividad eléctrica inespecífica subsecuente, representada por los choques electroconvulsivos, teniendo un carácter de mayor permanencia.

Observaciones como ésta, han reanimado la búsqueda de evidencias en el sentido de que el SNC pueda, en efecto, modificar los patrones de conexión en sus redes como consecuencia de algún tipo de actividad eléctrica nerviosa. Y, ciertamente, se ha encontrado que las modificaciones en la actividad nerviosa tienen consecuencias sobre los patrones sinápticos en el SNC. Los efectos más dramáticos han sido observados en las preparaciones experimentales de modelos de epilepsia y fundamentalmente en las fibras musgosas del hipocampo.

En los modelos de epilepsia experimental utilizando kindling eléctrico¹ o la inyección de agentes convulsivos como la pilocarpina o el kainato, se han logrado detectar cambios masivos en los patrones sinápticos de las fibras musgosas. La mayoría de los estudios (Wuarin y Dudek, 1996; Ebert y Löscher, 1995; Okazaki et al., 1995; Represa et al., 1993; Cavazos et al., 1991; Sutula et al., 1988) han observado la aparición de grandes cantidades de botones sinápticos de las fibras musgosas en la capa molecular del giro dentado, región donde normalmente son inexistentes. Asimismo, Represa y Ben-Ari (1992), detectaron reorganización sináptica hacia la zona de las dendritas basales de las células piramidales de CA3 (*stratum oriens*) tanto con kindling eléctrico como con la inyección de agentes convulsivos. En pacientes con epilepsia de lóbulo temporal, también se ha encontrado reorganización sináptica de las fibras musgosas hacia la capa molecular del giro dentado (Franck et al., 1995; Houser et al., 1990; de Lanerolle et al., 1989) (fig.10).

1 El kindling eléctrico es un proceso ampliamente utilizado para inducir actividad convulsiva crónica en animales. Consiste en la estimulación eléctrica subconvulsiva aplicada de manera repetitiva (a intervalos regulares) en algunas regiones del cerebro originando la aparición subsecuente de una condición epiléptica crónica o permanente. Algunas de las regiones cerebrales con mayor susceptibilidad a desarrollar el fenómeno son la amígdala y el hipocampo.

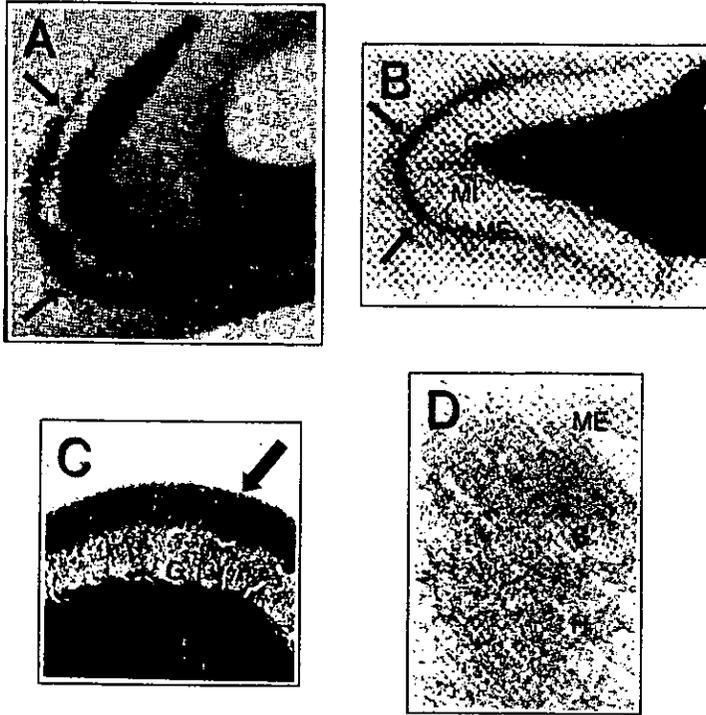


Fig. 10. Reorganización sináptica en el hipocampo. A. Región CA3 del hipocampo de rata, mostrando la aparición de botones sinápticos musgosos en el *stratum oriens* (flechas), después de la administración de ácido kaínico. B. Giro dentado de rata mostrando la aparición de una banda de botones sinápticos (flechas) en la capa molecular externa tras la administración de pilocarpina. C. Giro dentado, mostrando (flecha), la aparición de botones sinápticos musgosos en la capa molecular después de kindling eléctrico. D. Corte de hipocampo humano proveniente de un paciente con epilepsia de lóbulo temporal intratable mostrando la presencia de botones musgosos en la capa molecular interna del giro dentado. Todas las preparaciones procesadas por la técnica de Timm. FM: fibras musgosas; rad, lu, pyr, or: *strata radiatum, lucidum, pyramidale* y *oriens*, respectivamente; G, MI, ME: capas granular, molecular interna y molecular externa del giro dentado; H: hilus. De Ben-Ari y Represa (A; 1990), Lemos y Cavalheiro (B; 1995), Ebert y Löscher (C; 1995) y Franck et al. (D; 1995).

Este tipo de sinapsis aberrantes o ectópicas, como les han denominado algunos autores (Ben-Ari y Represa, 1990), han sido detectadas generalmente utilizando la técnica de Timm. Pero estos hallazgos han sido también corroborados utilizando otras técnicas como Golgi (Represa y Ben-Ari, 1992), trazadores de vías neurales (fig. 11) (Okazaki et al., 1995; Franck et al., 1995), o microscopía electrónica (Represa et al., 1993).

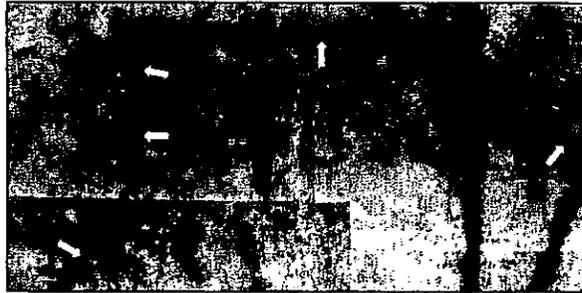


Fig. 11. Axón musgoso recurrente que penetra en la capa granular del giro dentado que exhibe los botones numerosos y de gran tamaño característicos de las fibras musgosas (flechas). En primer plano (ramas gruesas), dendritas de una célula granular. Foto realizada con el trazador retrógrado biocitina en animales con administración de ácido kaínico. De Okazaki et al. (1995).

Es entonces claro que la actividad eléctrica resultante de fenómenos de epilepsia (i.e. actividad convulsiva), tanto patológica (en humanos) como en los modelos experimentales, tiene como consecuencia la producción de nuevas colaterales axónicas en el campo proximal y terminal de las fibras musgosas hipocámpales, que redunda en la formación de nuevas sinapsis (fig. 12).

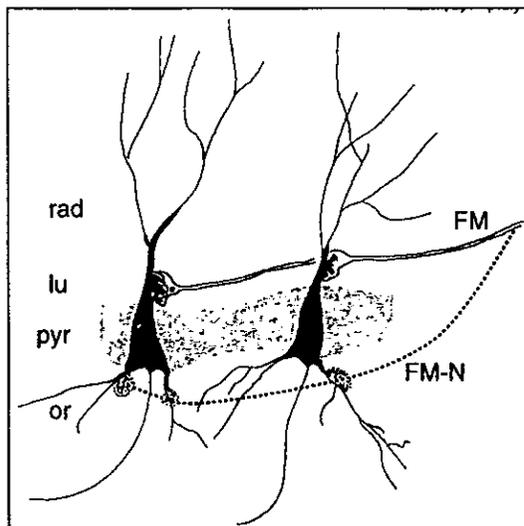


Fig. 12. Esquema donde se muestra la posible ruta que siguen los axones que dan origen a los botones musgosos en el *stratum oriens* del hipocampo después de crisis convulsivas. FM: fibras musgosas; FM-N: Fibras musgosas nuevas; rad: *stratum radiatum*; lu: *stratum lucidum*; py: *stratum pyramidale*; or: *stratum oriens*. Modificado de Ben-Ari y Represa, 1990.

La actividad epiléptica ha logrado relacionarse con la potenciación a largo plazo al observarse que después de actividad convulsiva en rebanadas de hipocampo, se logra observar una facilitación de la transmisión sináptica muy semejante a la potenciación a largo plazo (Anikhztejn et al., 1991; Ben-Ari y Gho, 1988). Esto parece indicar que en el hipocampo la inducción de la actividad de disparo epileptogénica podría involucrar mecanismos similares a los involucrados en la plasticidad sináptica en el caso de la PLP (Represa et al, 1994). Esta relación entre los fenómenos de epilepsia y fenómenos eléctricos relacionados con los procesos de aprendizaje tales como la potenciación a largo plazo, ha hecho pensar que los fenómenos a nivel celular y molecular que subyacen a estos fenómenos plásticos, no sólo son similares entre sí, sino que son los que subyacen a todos los fenómenos plásticos.

Un fenómeno que confirma aún más esta relación entre la actividad eléctrica convulsiva y la PLP es el hallazgo de sinaptogénesis de las fibras musgosas tras la inducción de PLP. Escobar et al. (1997; 1994b) y Adams et al., (1997b), encontraron que después de la estimulación inductora de PLP en las fibras musgosas, se observaba una reorganización sináptica hacia el *stratum oriens* en la región CA3, muy semejante a la que observaron Represa y Ben-Ari (1992) como resultado de crisis convulsivas.

Este fenómeno ha permitido realizar un puente entre las modificaciones estructurales en el SNC y la actividad eléctrica no convulsiva, la cual es más parecida a la actividad fisiológica que subyacería a los procesos de aprendizaje y memoria. En esta línea, la relación ya postulada (Desmond y Levy, 1988) entre la actividad eléctrica inductora de PLP y las modificaciones a nivel microestructural (forma y área de espinas dendríticas y botones terminales), se ha visto confirmada en estudios donde se observa que la inactivación de la proteína de adhesión celular específica de las neuronas (NCAM) altera la posibilidad de las células de modificar sus patrones de conexión (el empalme dirigido célula-célula), e impide la inducción de PLP (Becker et al., 1995, 1996). Este tipo de modificaciones a nivel microestructural han sido confirmados recientemente en

estudios de microscopía electrónica del fenómeno de PLP donde se observan cambios en la morfología de las sinapsis potenciadas (Buchs y Muller, 1996).

Asimismo, existen evidencias que confirman la relación de las modificaciones sinápticas y la PLP con el aprendizaje espacial. Por ejemplo, Conquet et al. (1994), lograron bloquear tanto la inducción de PLP como el aprendizaje del laberinto de agua de Morris, suprimiendo el gen que codifica para un tipo de receptor metabotrópico al glutamato (mGlu1), el cual se sabe que interviene en los procesos de potenciación y transmisión sináptica. Aún más, se ha logrado impedir el aprendizaje del laberinto de agua de Morris bloqueando la actividad de las proteínas de adhesión celular neuronales (NCAM), las cuales se sabe que tienen fundamental importancia en las modificaciones sinápticas (Becker et al. 1995, 1996).

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dado que se ha observado que las fibras musgosas son susceptibles de experimentar reorganización sináptica de sus proyecciones terminales en diferentes situaciones experimentales (e.g. Ben-Ari y Represa, 1990; Adams et al., 1997b; Andrade et al., 1995), nos propusimos explorar las modificaciones sinápticas generadas en respuesta a la ejecución de una tarea de aprendizaje espacial.

La tarea seleccionada fue el laberinto de agua de Morris (Morris, 1981). La selección de la tarea responde a la evidencia generada en relación a los siguientes factores: a) la marcada participación del hipocampo en el aprendizaje de tareas espaciales (e.g. Auer et al., 1989); b) la relación que existe entre la PLP tanto con la ejecución de tareas de tipo espacial (e.g. Mitsuno et al., 1994) como con la generación de nuevas sinapsis (e.g. Adams et al., 1997b); c) la susceptibilidad a la modificación del patrón sináptico de las fibras musgosas ante diversas situaciones experimentales (e.g. Ben-Ari y Represa, 1990); y d) la

estudios de microscopía electrónica del fenómeno de PLP donde se observan cambios en la morfología de las sinapsis potenciadas (Buchs y Muller, 1996).

Asimismo, existen evidencias que confirman la relación de las modificaciones sinápticas y la PLP con el aprendizaje espacial. Por ejemplo, Conquet et al. (1994), lograron bloquear tanto la inducción de PLP como el aprendizaje del laberinto de agua de Morris, suprimiendo el gen que codifica para un tipo de receptor metabotrópico al glutamato (mGlu1), el cual se sabe que interviene en los procesos de potenciación y transmisión sináptica. Aún más, se ha logrado impedir el aprendizaje del laberinto de agua de Morris bloqueando la actividad de las proteínas de adhesión celular neuronales (NCAM), las cuales se sabe que tienen fundamental importancia en las modificaciones sinápticas (Becker et al. 1995, 1996).

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dado que se ha observado que las fibras musgosas son susceptibles de experimentar reorganización sináptica de sus proyecciones terminales en diferentes situaciones experimentales (e.g. Ben-Ari y Represa, 1990; Adams et al., 1997b; Andrade et al., 1995), nos propusimos explorar las modificaciones sinápticas generadas en respuesta a la ejecución de una tarea de aprendizaje espacial.

La tarea seleccionada fue el laberinto de agua de Morris (Morris, 1981). La selección de la tarea responde a la evidencia generada en relación a los siguientes factores: a) la marcada participación del hipocampo en el aprendizaje de tareas espaciales (e.g. Auer et al., 1989); b) la relación que existe entre la PLP tanto con la ejecución de tareas de tipo espacial (e.g. Mitsuno et al., 1994) como con la generación de nuevas sinapsis (e.g. Adams et al., 1997b); c) la susceptibilidad a la modificación del patrón sináptico de las fibras musgosas ante diversas situaciones experimentales (e.g. Ben-Ari y Represa, 1990); y d) la

evidencia representada por los estudios que relacionan la actividad neural en el hipocampo con la ejecución del laberinto de agua (Conquet et al., 1994; Becker et al., 1996).

Para tal efecto, el presente estudio pretendió:

1. Mostrar que los sujetos aprenden con éxito el laberinto de agua de Morris, utilizando para ello los parámetros de latencia de llegada a la plataforma y de distancia recorrida en la búsqueda de la misma.

2. Analizar los cambios en la distribución del patrón sináptico de las fibras musgosas que pudieran resultar del aprendizaje del laberinto de agua de Morris, utilizando para ello la técnica histológica de Timm.

3. Cuantificar los cambios en el patrón sináptico que se observen en los diferentes grupos experimentales por medio de la densitometría de imágenes digitalizadas.

4. Explorar la relación del fenómeno con la intensidad de la actividad nerviosa relacionada al aprendizaje, determinando para ello el número mínimo de ensayos necesarios para la inducción de sinaptogénesis en las fibras musgosas

5. Deslindar los componentes no espaciales de la tarea empleada, así como los efectos del estrés, implementando para ello un grupo entrenado en la tarea de prevención pasiva.

6. Evaluar y discutir los resultados a la luz de las teorías que intentan explicar el almacenamiento de información en el sistema nervioso.

VI. PROCEDIMIENTO

El presente estudio constó de dos fases experimentales cuya metodología general se describe a continuación.

evidencia representada por los estudios que relacionan la actividad neural en el hipocampo con la ejecución del laberinto de agua (Conquet et al., 1994; Becker et al., 1996).

Para tal efecto, el presente estudio pretendió:

1. Mostrar que los sujetos aprenden con éxito el laberinto de agua de Morris, utilizando para ello los parámetros de latencia de llegada a la plataforma y de distancia recorrida en la búsqueda de la misma.

2. Analizar los cambios en la distribución del patrón sináptico de las fibras musgosas que pudieran resultar del aprendizaje del laberinto de agua de Morris, utilizando para ello la técnica histológica de Timm.

3. Cuantificar los cambios en el patrón sináptico que se observen en los diferentes grupos experimentales por medio de la densitometría de imágenes digitalizadas.

4. Explorar la relación del fenómeno con la intensidad de la actividad nerviosa relacionada al aprendizaje, determinando para ello el número mínimo de ensayos necesarios para la inducción de sinaptogénesis en las fibras musgosas

5. Deslindar los componentes no espaciales de la tarea empleada, así como los efectos del estrés, implementando para ello un grupo entrenado en la tarea de prevención pasiva.

6. Evaluar y discutir los resultados a la luz de las teorías que intentan explicar el almacenamiento de información en el sistema nervioso.

VI. PROCEDIMIENTO

El presente estudio constó de dos fases experimentales cuya metodología general se describe a continuación.

Vla. Sujetos.

Todos los animales empleados en el presente estudio fueron ratas machos de la cepa Wistar, con pesos entre 250-350 g. Se les mantuvo desde su llegada al laboratorio y durante los experimentos, en cajas individuales de acrílico con agua y alimento *ad libitum.*, en un ciclo de luz-obscuridad 12:12 h (luz, 9:00-21:00).

Vlb. Laberinto de agua.

El entrenamiento en esta tarea consiste en colocar a los animales en un estanque con agua, para que éstos encuentren nadando un blanco invisible para ellos (plataforma sumergida), guiándose únicamente por pistas que se encuentran fuera del estanque en cuestión.

En el presente estudio se utilizó un estanque circular con dimensiones de 100 cm de diámetro y 85 cm de profundidad. Como plataforma de seguridad se utilizó una columna de acrílico transparente con una base cuadrada de 10 cm por lado y una altura de 24 cm sujeta al fondo del estanque. El agua utilizada (22-23°) alcanzó una profundidad de 25 cm, de tal forma que la plataforma de seguridad quedó sumergida 1 cm.

El registro de la conducta se efectuó utilizando un sistema de circuito cerrado de TV conectado a una computadora (ChromoTrack 3.0; San Diego Instruments, San Diego, CA, E.U.) que digitalizó y procesó los parámetros espaciales y temporales de la ejecución de los animales en el laberinto de agua (fig. 13). De esta forma se obtuvo el registro para cada animal, tanto del tiempo que demoraba en alcanzar la plataforma a partir del momento en el que se le colocaba en el agua, como la distancia recorrida por el mismo durante este intervalo de tiempo.

Vlc. Prevención pasiva.

La prevención pasiva se llevó a cabo en cajas provistas de dos cámaras con dimensiones de 30x40x15 cm, separadas por una puerta deslizable. Una de

las cámaras se ilumina artificialmente mientras la otra permanece a oscuras. Esta última está provista de placas metálicas a través de las cuales se aplican choques eléctricos. Durante la sesión de adquisición, los animales fueron colocados en la cámara iluminada y, después de 30 s, la puerta deslizable fue abierta permitiendo a la rata entrar al compartimento oscuro. El tiempo transcurrido desde que la puerta se abre hasta que la rata penetra en el compartimento oscuro se registra como latencia basal. Posteriormente, la puerta se cierra y se administra un choque eléctrico con 0.8 mA DC durante 3 s, al cabo de los cuales se abre la puerta y se permite al animal regresar al lado iluminado. Este entrenamiento se repitió durante tres días (Escobar et al., 1994a).

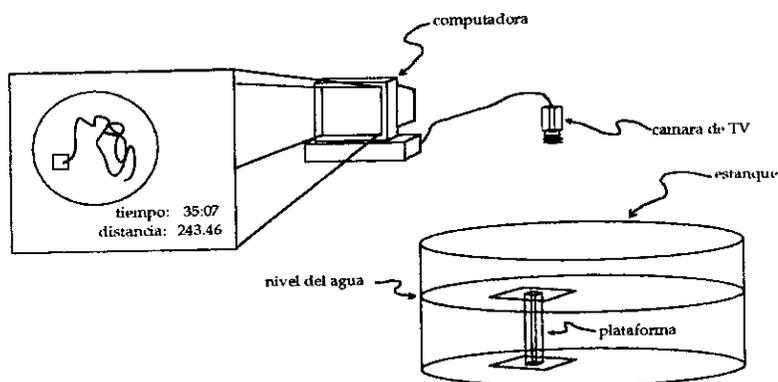


Fig. 13. Diagrama del laberinto de agua y sistema cerrado de TV.

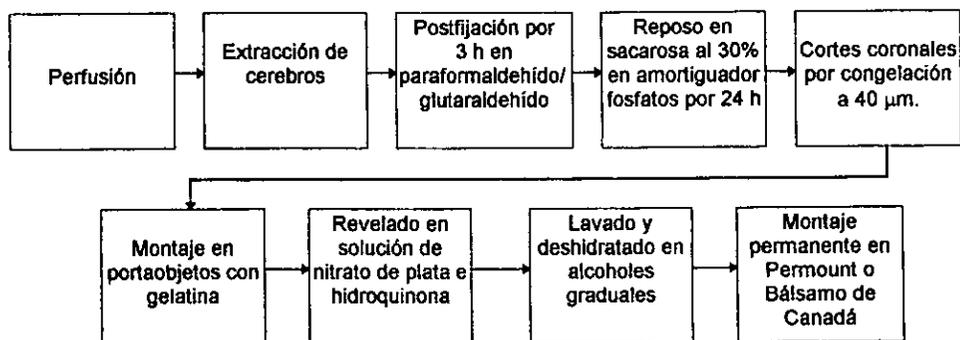
VId. Técnica histológica de Timm para metales pesados.

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

Los animales fueron anestesiados profundamente con pentobarbital sódico Anestestal (Pfizer) y perfundidos transcárdialmente con 250 ml de una solución

acuosa de sulfuro de sodio al 0.4%, seguido de 250 ml de una solución de paraformaldehído al 1% y glutaraldehído al 1.25%. Posteriormente los cerebros fueron extraídos y sumergidos en la misma solución fijadora por alrededor de 3 horas, transfiriéndose después a una solución amortiguadora conteniendo sacarosa al 30%. Al cabo de aproximadamente dos días, los cerebros fueron cortados por congelación en un microtomo (Reichert-Jung, Austria), obteniéndose secciones coronales de 40 μm , las cuales fueron conservadas en amortiguador fosfatos-salina 0.1 M hasta su montaje en portaobjetos cubiertos con gelatina. Una vez montadas y secas, las secciones fueron reveladas en la obscuridad en una mezcla 12:6:2 de goma arábica (20%), hidroquinona (5.6%) y amortiguador citratos, a la que se agregó 1.5 ml de una solución al 17% de nitrato de plata. Los reactivos empleados en esta etapa fueron obtenidos de la compañía Sigma (E.U.). Tras el revelado, se procedió al lavado en agua corriente (10 min) y agua destilada (10 min). Posteriormente fueron deshidratadas en una serie de alcoholes graduales al 50%, 70%, 80% y 96%, isopropanol, alfa-terpenol y xilol (todos al paso). Inmediatamente después, fueron cubiertos y montados con Permunt (Fisher, E.U.) o Bálsamo de Canadá (Sigma, E.U.). Los cortes fueron examinados por microscopía de luz con el propósito de evaluar la presencia y distribución de los botones sinápticos de las fibras musgosas.

DIAGRAMA DE FLUJO DE LA TÉCNICA DE TIMM



Vle. Análisis por densitometría de imágenes digitalizadas.

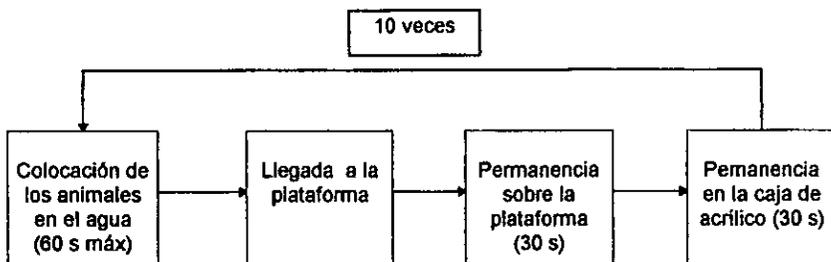
El análisis densitométrico efectuado en la presente investigación, se realizó digitalizando imágenes de las secciones procesadas por la técnica de Timm por medio de una cámara de video Hamamatsu (Japón) de alta resolución, montada en un microscopio Nikon (Japón) y utilizando el programa Image de captura y procesamiento de imágenes (NIH, Bethesda, MD. E.U.) en una computadora Macintosh II (Apple, E.U.). En las imágenes así digitalizadas, ubicadas entre las coordenadas A.P. -2.8 y -3.8 a partir de bregma de acuerdo al atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (1982), se midió el área ocupada por los gránulos de plata (reacción positiva al procedimiento de Timm) en el *stratum oriens*, cuyo rango de densidad óptica fuera idéntica al detectado en el *stratum lucidum*, correspondiente a la proyección principal de las fibras musgosas.

Vlf. Descripción de las fases experimentales

Vlf.1. Fase I.

Con el propósito de explorar el efecto que pudiera tener el entrenamiento en la tarea del laberinto de agua sobre la organización sináptica de las fibras musgosas, se utilizaron 30 ratas distribuidas aleatoriamente en los siguientes grupos: grupo LA, entrenado en el laberinto de agua ($n = 10$); grupo CN, control de nado ($n = 10$); y grupo CI, control intacto ($n = 10$).

El grupo LA fue entrenado en el laberinto de agua siguiendo un procedimiento modificado de Morris (1981) para el aprendizaje espacial durante 3 días. Cada día de entrenamiento, los animales fueron colocados en el estanque con el objeto de que aprendieran a localizar la plataforma utilizando 10 diferentes posiciones iniciales para cada ensayo en un total de 10 ensayos por día. El tiempo entre ensayos fue de 60 s distribuidos de la siguiente forma: 30 s sobre la plataforma después de que el animal la localiza, y 30 s en una caja de acrílico fuera del estanque. El tiempo de búsqueda máximo fue de 60 s, al cabo del cual se daba por terminado el ensayo.



Los animales del grupo CN (control de nado) se sometieron a una prueba de nado en el mismo estanque empleado para el grupo anterior, pero en ausencia de la plataforma de seguridad. Cada día, se colocaron los animales en el agua tres veces, permitiendo un tiempo de nado de 60 s en cada ensayo, y un periodo entre ensayos de 60 s (en la caja de acrílico fuera del estanque). Con este procedimiento se aisló el componente de aprendizaje espacial presente en la tarea, de los efectos de la manipulación, la actividad motora del nado y el contacto con el agua.

Finalmente, el grupo CI (control intacto), no recibió ningún tipo de entrenamiento permaneciendo en sus cajas-habitación durante todo el experimento.

Siete días tras la finalización del entrenamiento en el laberinto de agua, siguiendo el protocolo de detección de sinaptogénesis por estimulación tetanizante inductora de PLP descrito por Escobar et al. (1994b; 1997), los animales de los grupos LA y CN, así como los animales del grupo CI, fueron procesados de acuerdo a la técnica de Timm para metales pesados. Una vez finalizado el procesamiento histológico, fueron analizados por densitometría de imágenes tal como se describió previamente. Las mediciones obtenidas fueron sometidas a un análisis de varianza (ANOVA) factorial empleando la prueba post-hoc de Fisher.

Vif.2. Fase II.

Como es sabido, la repetición de una tarea facilita el establecimiento de la memoria (Bailey y Kandel, 1993). Así, en una etapa subsecuente de nuestras investigaciones llevada a cabo con el fin de determinar el número mínimo de ensayos necesarios para la inducción de sinaptogénesis en las fibras musgosas, efectuamos experimentos en los cuales 45 animales fueron divididos en cinco grupos. Los primeros tres grupos fueron entrenados en el laberinto de agua durante uno (LA1; n = 10), dos (LA2; n = 10) y tres días (LA3; n = 11). El cuarto grupo fue utilizado como control de nado (CN; n = 7). Adicionalmente, con el fin de deslindar los componentes no espaciales de la tarea empleada, así como los efectos del estrés, el último grupo de animales recibió la adquisición repetitiva de la tarea de prevención pasiva (PP; n = 5), la cual ha sido considerada como una tarea de aprendizaje inducida por estrés (Bernabeu, et al. 1997). Este entrenamiento se efectuó de la manera descrita en la metodología general.

Todos los animales fueron sacrificados 7 días después de la última sesión de entrenamiento y sus cerebros procesados de acuerdo a la histoquímica de Timm previamente descrita. El análisis histológico, densitométrico y estadístico de los resultados derivados de estos grupos se efectuó de forma similar a la descrita en la sección anterior.

Vig. Resumen de los grupos que conforman el procedimiento experimental.

FASE I		FASE II	
Experimentales	Controles	Experimentales	Controles
LA: n = 10	CN: n = 10	LA1: n = 10	CN: n = 7
	Cl: n = 10	LA2: n = 10	PP: n = 5
		LA3: n = 11	

VII. RESULTADOS

VIIa. Fase I.

El entrenamiento en el laberinto de agua (grupo LA) tuvo como resultado la disminución en el tiempo de llegada a la plataforma así como en la distancia recorrida, lo cual concuerda con lo obtenido por Morris (1981). El análisis de varianza de repetidas medidas mostró diferencias estadísticamente significativas para el tiempo ($F_{13,29} = 23.65$; $p < 0.0001$) y la distancia ($F_{13,29} = 22.59$; $p < 0.0001$), durante los días de entrenamiento. Esta disminución en el tiempo y la distancia es, en esta tarea, el indicador del aprendizaje de la localidad espacial, concluyéndose entonces, que los animales efectivamente aprendieron la tarea del laberinto de agua (fig 14).

En los animales del grupo control de nado, no se observó ninguna disminución en el tiempo, manteniéndose éste constante en 60 s a lo largo de todo el entrenamiento (fig. 14). La distancia recorrida muestra una ligera tendencia a disminuir a lo largo de los tres días, lo cual parece deberse a una habituación de la situación, al ser el escape imposible. Esta tendencia fue observada en especial en el último día del entrenamiento, donde los animales realizaban sólo los movimientos de nado necesarios para mantenerse a flote y no ahogarse.

VIIa. 1. Resultados Histológicos.

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

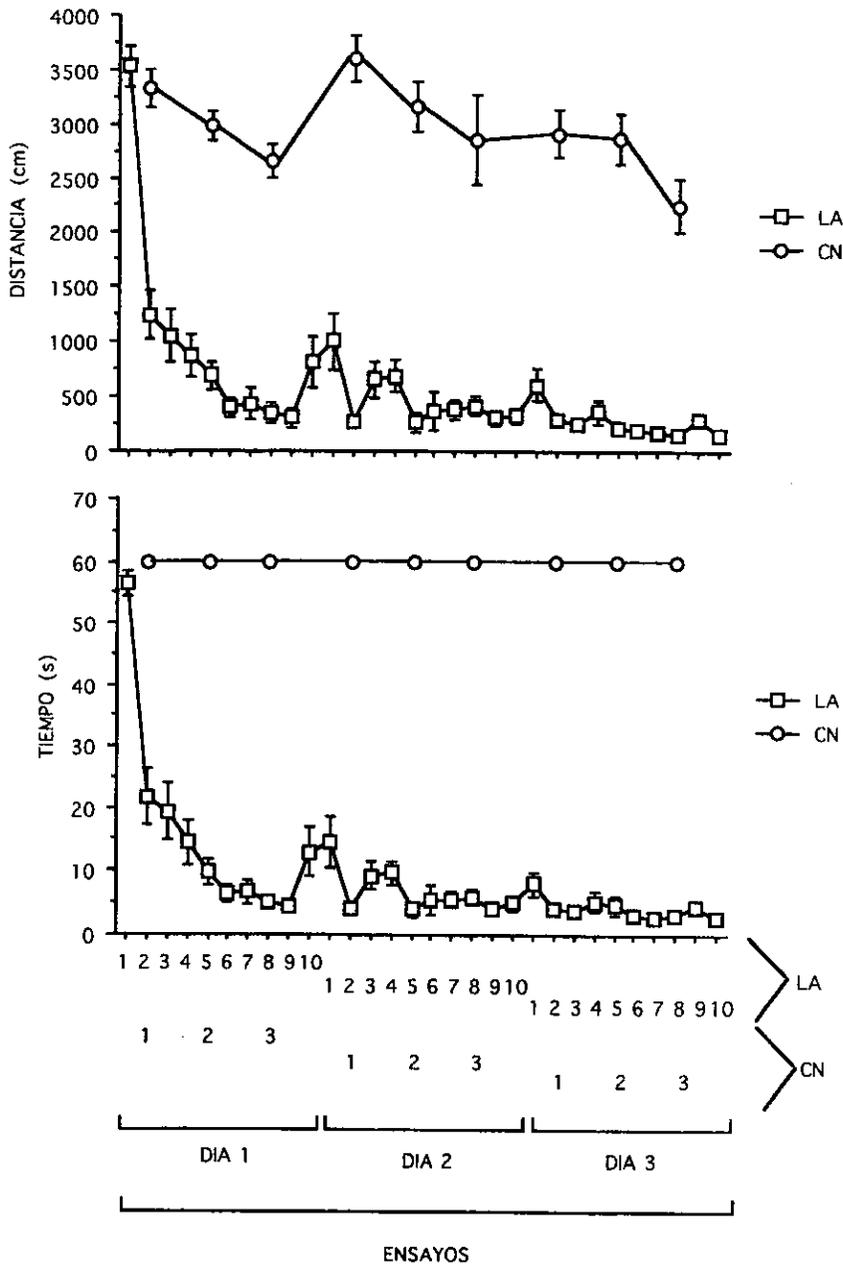


Fig. 14. Gráficas del tiempo y la distancia recorridas en función del número de ensayos. Se expresa, en las abscisas, el número del ensayo para ambos grupos, y en las ordenadas, el tiempo o la distancia. Se expresan los valores promediados ($x \pm e.e.$) por grupo por ensayo.

superior a la zona de las células piramidales del área CA3, y llegando hasta el límite con el área CA1. La región distal del área CA3 correspondiente a la zona infrapiramidal (*stratum oriens*), se encontró libre de gránulos de plata en la mayoría de los animales del grupo CI. (figs. 15 y 16, A y B).

En los animales entrenados en el laberinto de agua (grupo LA), se observó de manera evidente en el microscopio de luz, además del patrón característico observado en los animales intactos (grupo CI), la aparición de una segunda banda positiva a la reacción de Timm, en la zona del *stratum oriens* (fig. 15 y 16, E, F). Este hecho reveló que en los animales entrenados en el laberinto de agua, el campo terminal de las fibras musgosas se había extendido hacia las dendritas basales del área CA3.

En los animales controles de nado (grupo CN), no se observó esta segunda banda conspicua (fig. 15 y 16, C, D), pudiéndose descartar de esta manera efectos inespecíficos del proceso de entrenamiento sobre los animales entrenados.

VII.2. Densitometría de imágenes digitalizadas.

El análisis densitométrico de las imágenes digitalizadas de los cortes confirmó de manera cuantitativa las diferencias presentes en el área de reacción positiva para Timm en la zona correspondiente al *stratum oriens* al extremo distal del área CA3. El análisis estadístico de estos datos reveló diferencias significativas ($F_{2,19} = 25$; $p < 0.01$) entre los grupos. El análisis post-hoc usando la prueba de Fisher reveló diferencias significativas al comparar el grupo LA3 con los grupos CI y CN ($p's < 0.001$), en tanto que los grupos CI y CN no presentaron diferencias estadísticamente significativas (fig. 17).

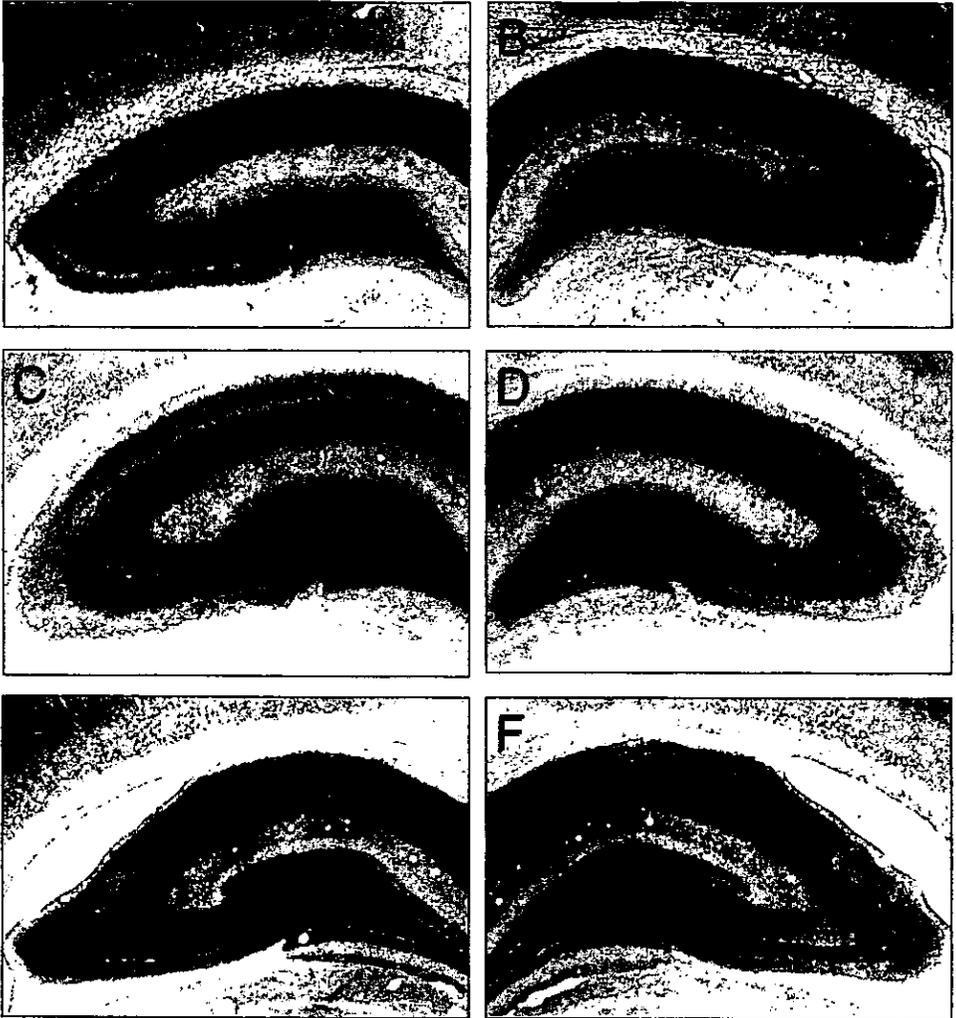


Fig. 15. Secciones coronales (40 μ m) de los hipocampos dorsales procesados por la técnica de Timm provenientes de los siguientes grupos: A, B: Control íntacto; C, D: Control de nado; E, F: Entrenado en el laberinto de agua. (x4).

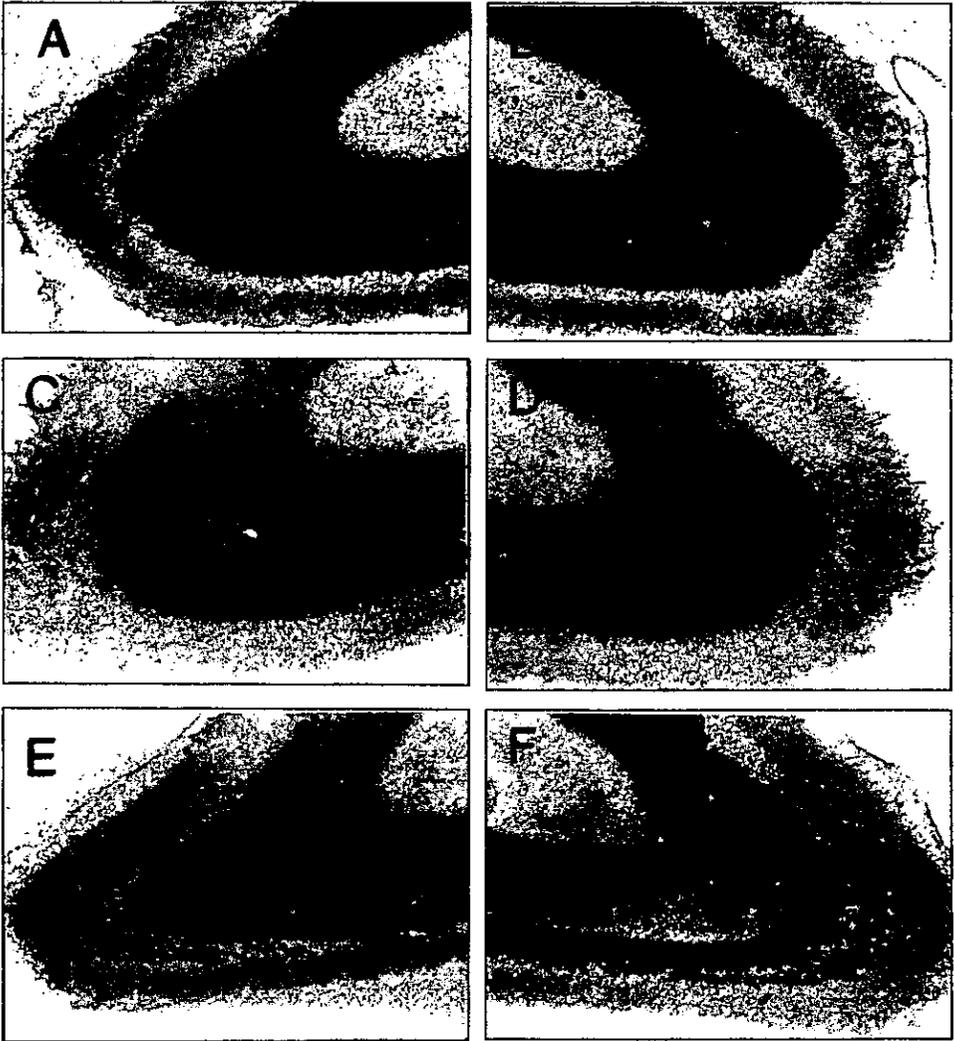


Fig. 16. Detalle de las secciones coronales (40 μm) de los hipocampos dorsales procesados por la técnica de Timm provenientes de los siguientes grupos: A, B: Control intacto; C, D: Control de nado; E, F: Entrenado en el laberinto de agua. ($\times 10$).

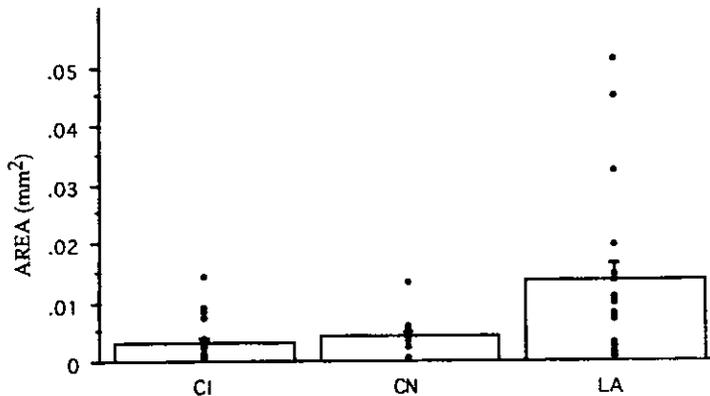


Fig. 17. Área de reacción positiva en el *stratum oriens* (mm²). Se expresan las áreas promediadas por grupo ($\bar{x} \pm e.e.$). CI: controles intactos; CN: controles de nado; LA: entrenados en laberinto de agua. * $p < 0.01$.

VIIb. Fase II.

El entrenamiento en el laberinto de agua tuvo un efecto análogo al observado en los animales del grupo LA de la fase anterior, a saber, la disminución en el tiempo y la distancia en función del número de ensayos. Las secciones procesadas por la técnica de Timm mostraron una progresión en la reacción positiva en el *stratum oriens* en función de los días del entrenamiento (fig. 18).

El análisis densitométrico reveló una progresión en las dimensiones del área por grupo en función de los días de entrenamiento, desde la menor en los animales del grupo LA1, hasta la mayor en el grupo LA3 con la extensión intermedia del grupo LA2 (con el cual el grupo LA3 no presenta diferencias estadísticamente significativas). El análisis de varianza de los datos de estos experimentos confirma esta tendencia ($F_{4,40} = 8.57$; $p < 0.001$). El análisis con la prueba post hoc de Fisher reveló que el área del *stratum oriens* positiva ante la reacción de Timm, muestra un incremento significativo al comparar los grupos LA3 y LA2 con los grupos LA1 (p 's<0.01), CN (p 's<0.001) y PP (p 's<0.001) (fig 19.). Los grupos LA1, CN y PP no mostraron diferencias significativas entre ellos.

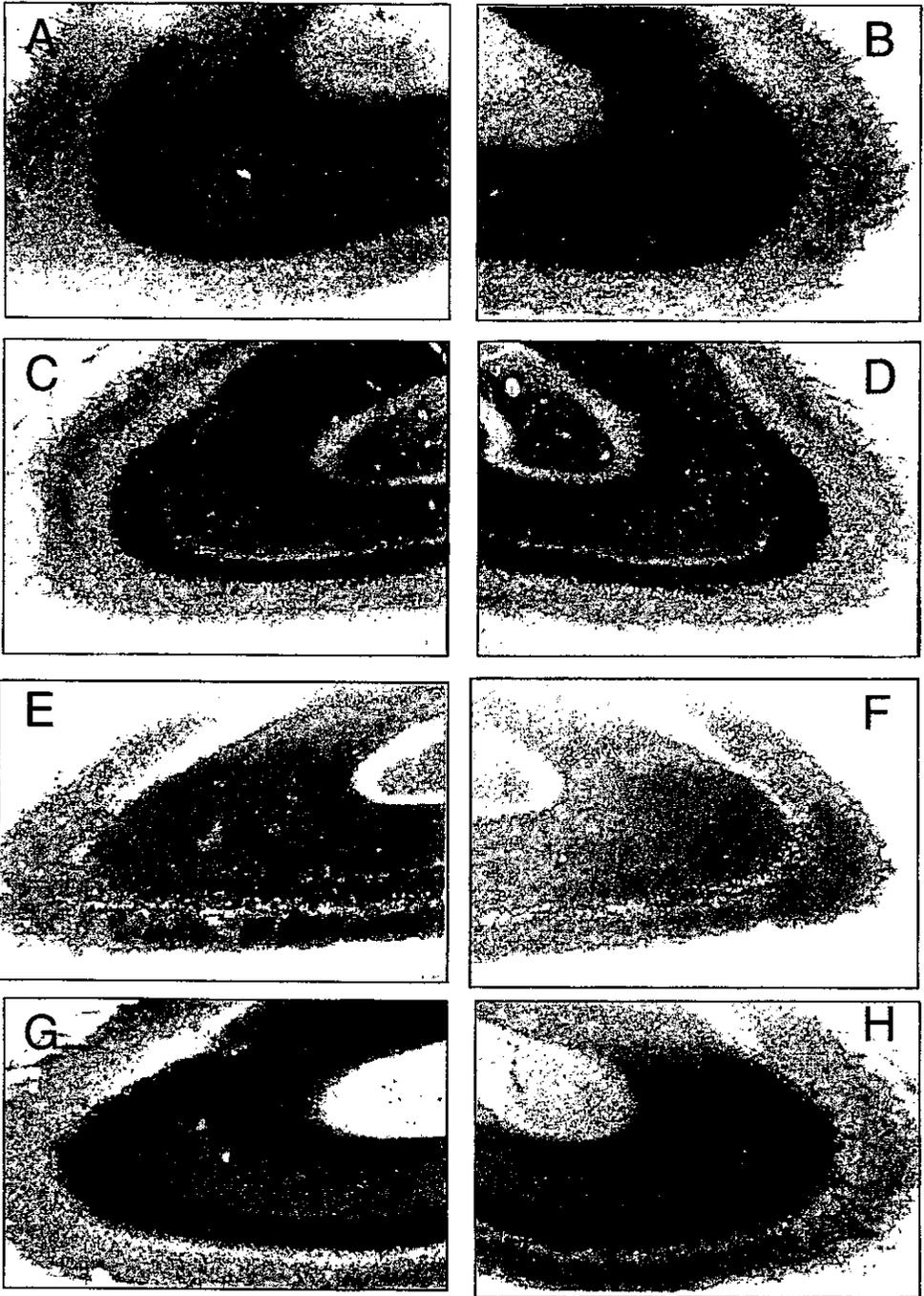


Fig. 18. Secciones coronales (40 μ m) provenientes de los hipocampos dorsales procesados por la técnica de Timm provenientes de los siguientes grupos: A, B: Control de nado; C, D: Entrenado por 1 día; E, F: Entrenado por 2 días. G, H: Entrenados en prevención pasiva. (x10).

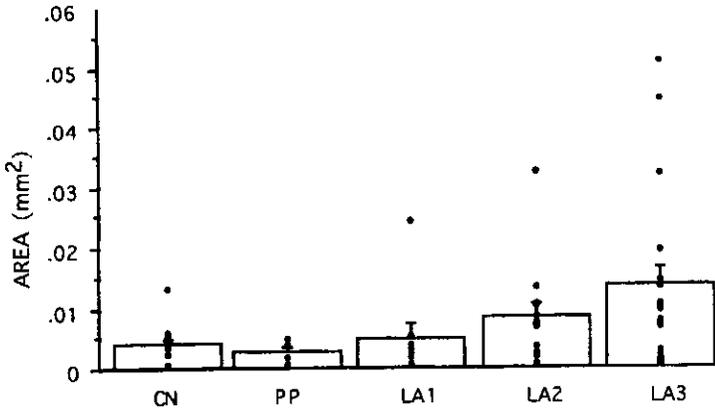


Fig. 19. Áreas de reacción positiva en el *stratum oriens* (mm²). Se expresan las áreas promediadas por grupo ($\bar{x} \pm E.E.$). LA3, LA2 y LA1: grupos entrenados en el laberinto de agua por 3 días, 2 días y 1 día, respectivamente. CN: control de nado; PP: prevención pasiva. ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$.

VIII. DISCUSION.

VIIIa. Resumen y discusión preliminar.

Como lo demostró Morris (1981), las ratas no necesitan de pistas proximales para encontrar un lugar en el espacio. Es decir, logran utilizar las pistas fuera del contexto inmediato del objetivo para llegar a él. Este es el caso de la tarea del laberinto de agua. El aprendizaje de la tarea quedó demostrado por los resultados descritos, donde puede observarse que en los animales de los grupos entrenados (LA), el tiempo de llegada y la distancia recorrida hasta el blanco es una función decreciente del número de ensayos. Este decremento se puede apreciar en cada uno de los días de entrenamiento.

Los animales controles de nado (CN) no disminuyeron significativamente la distancia recorrida, ni el tiempo, ya que no había plataforma presente. Este tipo de actividad intentó separar los componentes específicos del aprendizaje de la tarea, de la actividad motora y estimulación medioambiental que forman parte de la misma.

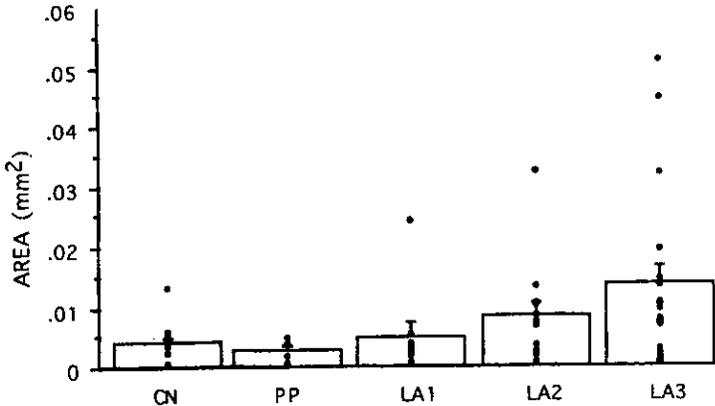


Fig. 19. Áreas de reacción positiva en el *stratum oriens* (mm²). Se expresan las áreas promediadas por grupo ($\bar{x} \pm E.E.$). LA3, LA2 y LA1: grupos entrenados en el laberinto de agua por 3 días, 2 días y 1 día, respectivamente. CN: control de nado; PP: prevención pasiva. ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$.

VIII. DISCUSION.

VIIIa. Resumen y discusión preliminar.

Como lo demostró Morris (1981), las ratas no necesitan de pistas proximales para encontrar un lugar en el espacio. Es decir, logran utilizar las pistas fuera del contexto inmediato del objetivo para llegar a él. Este es el caso de la tarea del laberinto de agua. El aprendizaje de la tarea quedó demostrado por los resultados descritos, donde puede observarse que en los animales de los grupos entrenados (LA), el tiempo de llegada y la distancia recorrida hasta el blanco es una función decreciente del número de ensayos. Este decremento se puede apreciar en cada uno de los días de entrenamiento.

Los animales controles de nado (CN) no disminuyeron significativamente la distancia recorrida, ni el tiempo, ya que no había plataforma presente. Este tipo de actividad intentó separar los componentes específicos del aprendizaje de la tarea, de la actividad motora y estimulación medioambiental que forman parte de la misma.

El procesamiento histológico por la técnica de Timm de los cerebros de los animales LA, mostró la presencia de una banda positiva a la reacción, en la zona del *stratum oriens* con un área sumada que fue significativamente mayor a la encontrada en los animales controles de nado y controles intactos, como reveló la cuantificación por densitometría de imágenes.

Como se describió anteriormente, la técnica de Timm permite observar la formación de gránulos de plata metálica en los tejidos, células o partes de ellas, en donde se encuentran metales pesados libres. Los botones de las fibras musgosas contienen altas concentraciones de zinc, por lo que dan una respuesta altamente positiva ante la reacción de Timm. Las diferencias entre los animales entrenados y los controles de nado e intactos, revelan la presencia de reorganización sináptica en las fibras musgosas hipocámpales en la zona del *stratum oriens* en los animales del primer grupo. Esta reorganización sináptica presenta características histológicas similares a las descritas por Represa y Ben-Ari (1992) en animales sometidos a actividad convulsiva, y por Escobar et al. (1997) y Adams et al. (1997b), en animales en donde se aplicó estimulación tetanizante inductora de PLP en las fibras musgosas (fig. 20).



Fig. 20. Reordenamiento sináptico de las fibras musgosas en el área CA3 como resultado de tres procedimientos experimentales distintos: A: kindling eléctrico; B: inducción de PLP en las fibras musgosas; C: entrenamiento en el laberinto de agua.

Experimentos posteriores efectuados en nuestro laboratorio, han corroborado la presencia de botones sinápticos en el *stratum oriens* de la región

CA3 hipocampal tras el entrenamiento en el laberinto de agua, utilizando la técnica de microscopía electrónica de transmisión. Dichos botones fueron identificados por las características típicas descritas para este tipo de terminal (Amaral y Dent, 1981; Gaarskjaer, 1986), entre las que se cuentan una gran cantidad de vesículas sinápticas con recubrimiento electrodenso, sinapsis asimétricas con densidades postsinápticas sobresalientes y sinapsis múltiples efectuadas por un mismo botón con una o varias espinas dendríticas (fig. 21).

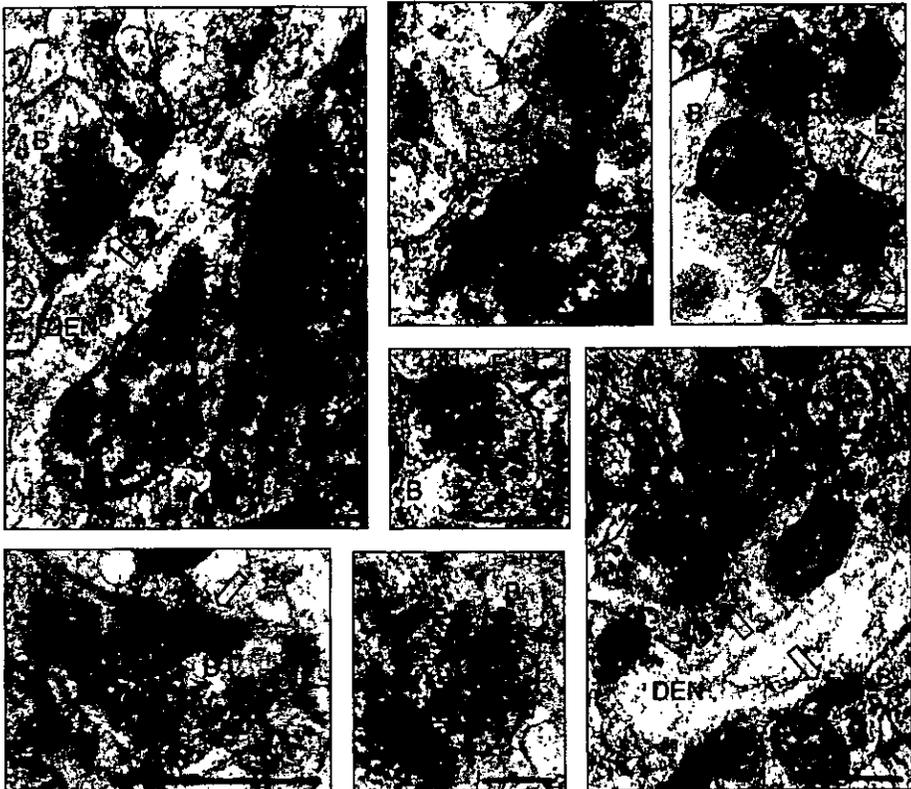


Fig. 21. Botones musgosos encontrados en la zona de las dendritas basales (*stratum oriens*) de las neuronas piramidales del área CA3 en animales entrenados en el laberinto de agua (ME-LA). DEN: dendrita; B: boton musgoso; E: espinas dendríticas. Barra = 500nm.

El análisis ultraestructural al microscopio electrónico permitió corroborar el fenómeno de reorganización sináptica revelado a través de la técnica de Timm al establecer una correlación entre la reacción positiva y la presencia de botones sinápticos de las fibras musgosas estableciendo contacto sináptico con las dendritas basales de las neuronas piramidales del área CA3 (fig.22).

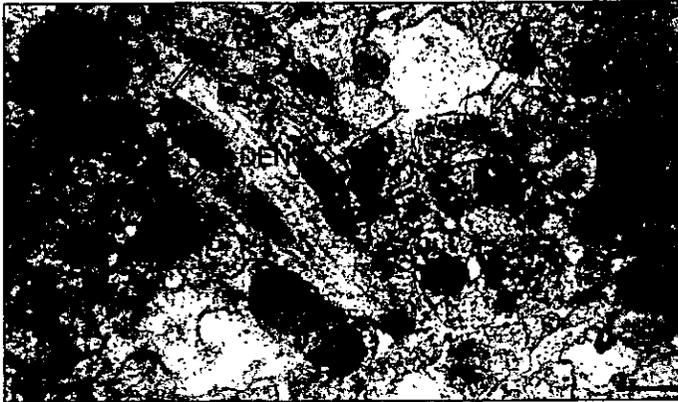


Fig. 22. Panorámica de la región basal (*stratum oriens*) de las neuronas piramidales del área CA3 en animales entrenados (ME-LA) mostrando la incidencia de sinapsis asimétricas (flechas) realizadas por botones musgosos con procesos dendríticos basales. DEN: dendrita. Barra = 500nm.

El tipo de reorganización sináptica descrita en el presente trabajo, así como la descrita en los anteriormente mencionados, corresponde, dada la organización laminar del hipocampo, a la zona de las dendritas basales de las células piramidales del área CA3. Es el tipo de sinapsis que Ben-Ari y Represa (1990) llamaron ectópicas o aberrantes. El motivo de este sobrenombre viene dado por la ausencia casi total de este tipo de sinapsis en el *stratum oriens* en ratas intactas de la cepa Wistar, en los niveles septo-temporales que han sido sistemáticamente explorados con la técnica de Timm y que se confirman en el presente trabajo por los resultados del grupo de animales intactos (CI).

Las nuevas sinapsis se formarían a partir de colaterales axónicas de las fibras musgosas ya existentes, que cruzan el *stratum pyramidale* para hacer contacto con la región basal de la células de esta capa.

Se ha observado que este tipo de conexiones tienen la morfología normal de las fibras musgosas, tanto en animales sometidos a epilepsia experimental (Represa y Ben-Ari, 1992), como en estudios en rebanadas (Robain et al., 1994). En el presente trabajo la presencia de botones musgosos morfológicamente normales en el *stratum oriens* permite suponer que la funcionalidad de estas sinapsis es también normal, y aún cuando las implicaciones funcionales de estos cambios morfológicos no están del todo comprendidas, el incremento en la densidad sináptica de las fibras musgosas en torno a las células piramidales del área CA3 de los animales sobreentrenados, sugiere que el incremento en la superficie de contacto sináptico, podría traducirse en un incremento en la eficiencia sináptica de la región involucrada.

Las modificaciones sinápticas descritas en el presente trabajo tienen su origen en la actividad nerviosa que resulta de los componentes específicos del aprendizaje implicado en la tarea espacial, puesto que ni la ejecución motora (como los demuestran los controles de nado), ni el estrés inducido por el entrenamiento en la prevención pasiva, son capaces de producir la generación de nuevas sinapsis. Esta aseveración cobra aún más sentido si pensamos en la muy documentada participación del hipocampo en el procesamiento de información espacial (e.g. O'Keefe, 1976), el aprendizaje de tareas espaciales (e.g. Olton y Papas, 1979; Aggleton et al., 1992) y especialmente en el aprendizaje del laberinto de agua (e.g. Auer et al., 1989; Morris, 1989). Más aún, al considerar la participación positiva de las fibras musgosas como subsistema dentro del hipocampo (e.g. Mitsuno et al., 1994; Schwegler et al., 1993). En este sentido, se ha reportado recientemente que el entrenamiento en tareas de aprendizaje espacial en ratas, es capaz de inducir reorganización sináptica del área CA1 del hipocampo (Rusakov et al., 1997).

Nuestras investigaciones revelan además, la progresión del proceso de sinaptogénesis en el *stratum oriens* en función del número de sesiones de entrenamiento, evidenciando así el curso temporal de las modificaciones sinápticas.

VIIIb. Relevancia del fenómeno para la investigación en las neurociencias.

La hipótesis de que la actividad relacionada al aprendizaje puede originar cambios en el sistema nervioso había sido ya ideada de forma primigenia por Descartes (citado por Lashley, 1950), en la proposición de que las modificaciones del sistema maestro de control de un organismo era lo que le permitían aprender y almacenar información. Posteriormente, cuando se comenzaron a elucidar los principios básicos del funcionamiento (e.g. Sherrington, 1947) y de la estructura celular (e.g. Ramón y Cajal, 1889) del sistema nervioso, y se empezó a estudiar la relación de su actividad con el aprendizaje (e.g. Pavlov, 1927), se formuló repetidas veces la predicción de que, si se observara con el debido detalle, deberían observarse modificaciones en los patrones de conexión entre las neuronas como resultado de la actividad de las mismas, actividad que resulta del aprendizaje. Desde entonces uno de los principales objetivos de la investigación sobre el sistema nervioso, ha sido el poder observar las modificaciones que sufre el SNC como consecuencia de la actividad de sus diferentes partes.

A finales de los años cuarenta, Hebb (1949) propuso un mecanismo a nivel celular, por el cual la fuerza de una conexión entre dos células podría ser aumentada por la actividad de éstas. Él decía que si dos neuronas conectadas entre sí se activaban simultáneamente, la conexión entre ellas adquiriría una fuerza mayor a la que anteriormente poseían. Es decir, se potenciaba la conexión. De esta forma, la activación de la neurona presináptica podría, por sí sola, evocar las respuestas en la segunda neurona, con un estímulo menor al que anteriormente se requería. Hebb (1949) extendió esta hipótesis al funcionamiento de redes de neuronas conectadas entre sí, que tuvieran la propiedad plástica anteriormente descrita. Él decía que, por ejemplo, al presentarse un estímulo ambiental como un círculo en el campo visual, se activaba un grupo de neuronas que representaba dicho círculo. Al desaparecer el estímulo ambiental, el grupo de neuronas que lo representaba seguirían activas por un periodo de tiempo que permitiría el fortalecimiento de algunas de las conexiones en este ensamble de

células. Posteriormente, al presentarse sólo una parte del estímulo ambiental (digamos un arco), la activación de las células correspondientes activaría, dada la potenciación sináptica adquirida, a las demás células que en conjunto dan la representación del círculo completo. De esta forma la potenciación de neuronas conectadas en redes permitiría guardar información compleja por tiempos prolongados.

Este tipo de modificaciones en la actividad nerviosa eran vistos como candidatos viables para describir el sustrato biológico de los procesos de aprendizaje y memoria. El descubrimiento del fenómeno de la potenciación a largo plazo en 1973 (Bliss y Lomo), fue una confirmación de las propuestas de Hebb con respecto a la plasticidad sináptica. Este fenómeno cobró relevancia inmediata debido a que tenía un gran paralelo con los fenómenos asociativos del aprendizaje. Por ejemplo, era dependiente de la actividad elevada en una vía determinada y tenía una duración relativamente prolongada.

Sin embargo, los investigadores han buscado mecanismos que tuvieran la suficiente permanencia como para poder explicar la conocida duración de los recuerdos (años, en nuestro caso), y que no fueran susceptibles a modificación como resultado de la actividad normal del SNC. La potenciación a largo plazo no parecía llenar este requisito, al menos en los primeros años de investigación.

Una de las primeras propuestas en este sentido fue la búsqueda de proteínas cuya estructura almacenara de alguna forma, la información que adquiriría el SNC (Ungar, 1971). Un experimento en este sentido fue en el que se intentaba demostrar el paso de un aprendizaje entre dos organismos por el paso de estas "proteínas de la memoria" (McConnell, 1962). En el citado experimento se condicionaba a unas planarias a una determinada combinación de estímulos. Después, estas planarias se machacaban y se daban como alimento a otras. Estas, después de haberse comido a las primeras, parecían recordar el condicionamiento de las primeras. Esto era tomado como indicio de que había una o varias moléculas que "guardaban" el aprendizaje de las primeras y así, podían transferirlo a las segundas.

Después de algunas investigaciones en torno a la búsqueda de las "proteínas de la memoria", se determinó que esta hipótesis del almacenamiento de la información no era correcta, dado lo infructuoso de la búsqueda de este tipo de moléculas (Squire, 1987). En el momento que se descartó esta hipótesis molecular de la memoria, la hipótesis favorecida fue la que concernía a las modificaciones a nivel sináptico (Squire, 1987). El enfoque molecular era sólo incorrecto en el sentido de buscar una especie de código molecular o moléculas que fueran moldeadas para almacenar información, dado que, como veremos más adelante, existen mecanismos a este nivel que se han logrado determinar como fundamentales en el proceso de remodelación sináptica.

Una de las primeras evidencias que apoyaban la hipótesis de los cambios estructurales dependientes de la actividad, fueron los estudios de ambientes enriquecidos. En estos estudios (e.g. Diamond et al., 1967) se encontró que había modificaciones en la estructura del SNC como resultado de la exposición, durante las primeras etapas de vida, a grandes cantidades de estimulación sensorial.

Este tipo de estudios cobró relevancia para el fenómeno del aprendizaje al observarse que animales sometidos a este tipo de estimulación en etapas tempranas de su vida, tenían una mejor ejecución en el laberinto de agua (e.g. Kempermann et al., 1997; Falkenberg et al., 1992).

La posibilidad de que las modificaciones sinápticas dependientes de la actividad representaran el sustrato de los procesos de aprendizaje, ha sido explorada por varios grupos entre los que destaca el de Greenough y cols. (e.g. Kleim et al., 1996). Estos investigadores han observado que el aprendizaje de una tarea trae consigo el aumento en el número de sinapsis en un área del SNC directamente relacionada con dicho aprendizaje, en este caso, la corteza motora. En este sentido, los resultados del presente trabajo revelan la presencia de un proceso análogo al reportado por el grupo de Greenough tanto en los aspectos morfológicos como en su correlación conductual. Esto permite especular acerca de la existencia de una relación entre el almacenaje de información pertinente a la ejecución de la tarea y las modificaciones sinápticas observadas.

El fenómeno de la potenciación a largo plazo fue traído a este campo cuando se propuso (Desmond y Levy, 1988) que los mecanismos de potenciación de sinapsis en el SNC son originados por cambios morfológicos a nivel de la sinapsis. Se proponía que modificaciones en el tamaño de las espinas dendríticas permitirían cambios en la resistencia y, por lo tanto, alterarían los umbrales de respuesta en la célula postsináptica, cambios que se observan como modificaciones en la respuesta eléctrica en el registro de la potenciación. Este tipo de cambios se ha confirmado recientemente por microscopía electrónica (Buchs y Muller, 1996) y ha sido apoyada por trabajos donde el bloqueo y/o la inactivación de moléculas neurales de adhesión entre células (NCAM; las cuales permiten las interacciones neurona-neurona, y por lo tanto, la reorganización sináptica) impide la inducción de potenciación a largo plazo (Becker et al., 1995; Hoffman et al., 1995). Sorprendentemente, el bloqueo de esta molécula tiene también efectos adversos sobre el aprendizaje del laberinto de agua (Becker et al., 1996), lo cual indica que la adecuada ejecución de esta tarea depende de la capacidad de las neuronas para reordenar su patrón sináptico. Estas evidencias tienen la importante implicación de que la modificación anatómico-estructural, ya sea a nivel sináptico o a nivel celular, parece ser el mecanismo por excelencia que el SNC utiliza para modificar sus patrones de actividad electrofisiológica.

VIIIc. Mecanismos neurofisiológicos de la remodelación sináptica.

Los trabajos que han observado modificaciones sinápticas dependientes de la actividad, han originado una serie de estudios que exploran los mecanismos celulares que posibilitan la remodelación sináptica. Entre estos estudios, destacan los relacionados a la remodelación de los patrones sinápticos de las fibras musgosas como consecuencia de actividad convulsiva. Se ha detectado, por ejemplo, la expresión de proteínas que tienen que ver con la generación de nuevas sinapsis después de periodos de actividad convulsiva: proteínas relacionadas a la liberación de neurotransmisores, factores tróficos y las proteínas estructurales citoesqueléticas. Por ejemplo, Kamphuis et al., (1995) observaron

que tras las crisis convulsivas aumenta la expresión del ARN mensajero para sintaxina 1B (proteína involucrada en la adhesión de las vesículas sinápticas para su eversión al espacio sináptico) en el hipocampo. Se han encontrado también, aumentos en la expresión tanto de los factores tróficos NGF (factor de crecimiento neuronal) y BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro), así como de algunos tipos de proteínas estructurales como MAP-2 (proteína asociada a los microtúbulos-2) y α -tubulina (Khrestchatisky et al., 1995; Pollard et al., 1994) (fig. 23). Además, se ha observado que el bloqueo del NGF retarda la inducción de convulsiones y la disminuye la reorganización sináptica resultante (Van der Zee et al., 1996); la administración de NGF, por el contrario, facilita estos procesos (Adams et al. 1997a). La relación del NGF con la plasticidad sináptica también se ha documentado al observarse un aumento en su expresión ante actividad electrofisiológica no convulsiva (Gall, 1993). Asimismo, recientemente se ha descrito la participación de la NCAM (molécula neural de adhesión celular) durante el proceso de aprendizaje espacial. En este sentido, Becker et al. (1996), observaron deterioro significativo tanto en la adquisición como en la retención de la tarea del laberinto de agua de Morris, al modificar la polisialilación de la NCAM.

Esta serie de estudios ha llevado a la postulación de mecanismos celulares generales que posibiliten la generación de nuevas sinapsis en el sistema nervioso central, los cuales, a su vez, podrían ser la base de los mecanismos plásticos que subyacen al aprendizaje y la memoria, y que tienen como consecuencia el almacenamiento de información a largo plazo (fig. 24).

Por último, se ha observado que los mecanismos celulares propuestos para explicar la reorganización sináptica tienen correlatos conductuales que permiten pensar que esa podría ser la clase de mecanismos que se desencadenan durante los procesos de aprendizaje (e.g. Buresova y Bures; Rosenblum et al., 1993).

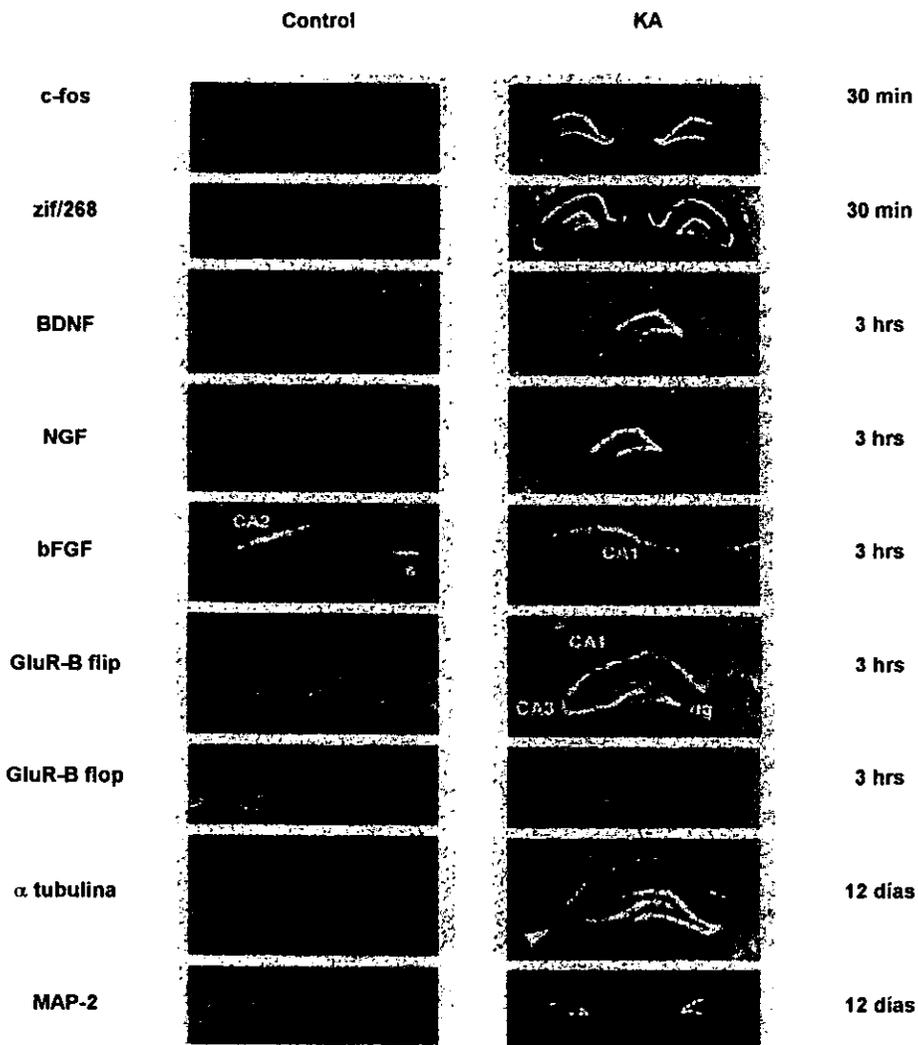


Fig. 23. Autoradiografías que muestran la expresión de ARNm de varias proteínas relevantes en la remodelación sináptica y los procesos de crecimiento y regeneración neuronal como consecuencia del kindling químico (por administración de agentes convulsivos). Tomada de Khretschatisky et al. (1995),

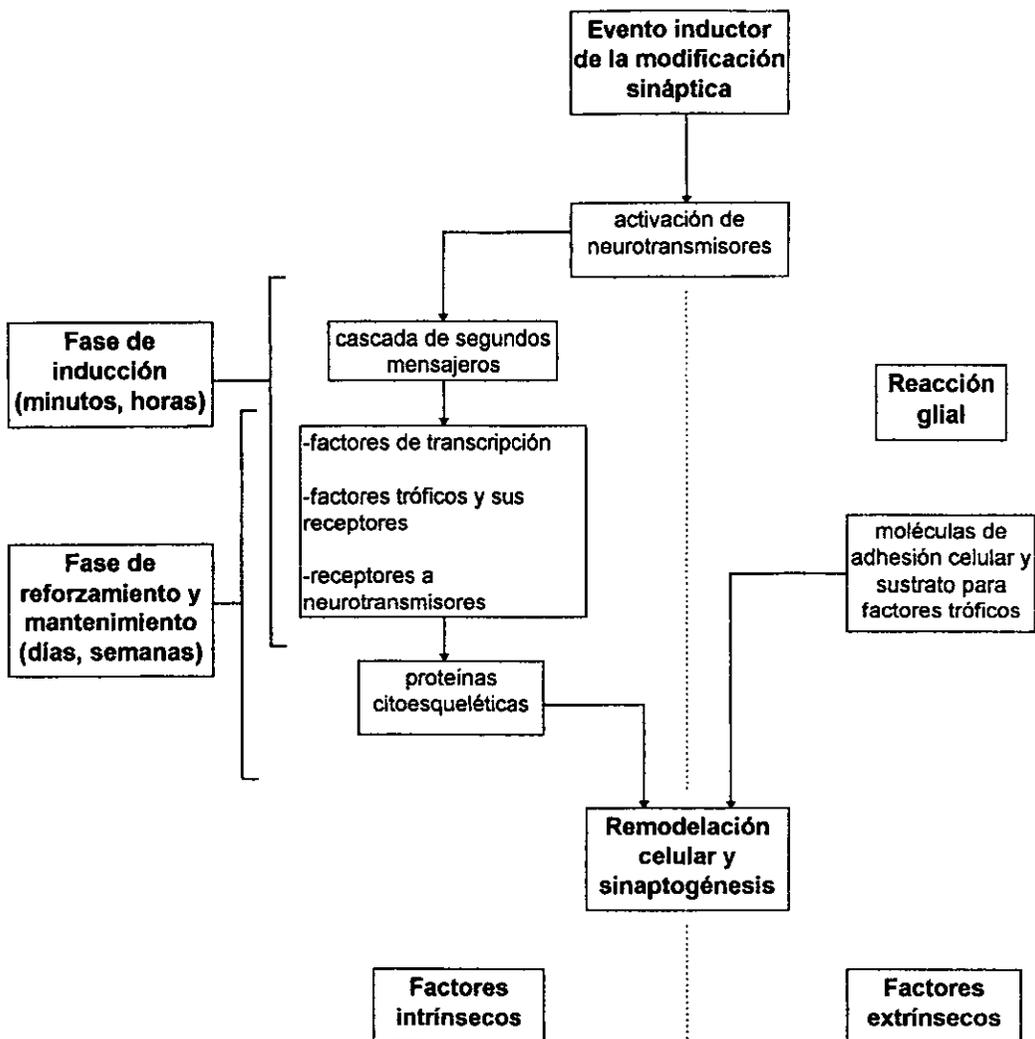


Fig. 24. Cascada de eventos celulares y bioquímicos que intervienen en la producción de nuevas terminales nerviosas como consecuencia de la sobreactivación de una región del cerebro. Modificado de Khretschatisky et al. (1995).

En resumen, la serie de estudios efectuados en la presente investigación sugiere que la sinaptogénesis de las fibras musgosas es inducida en respuesta a la ejecución de una tarea de aprendizaje espacial, lo cual respalda la hipótesis de que las modificaciones estructurales pueden ser consecuencia directa de la actividad fisiológica normal relacionada con los procesos de aprendizaje.

REFERENCIAS

- Abraham, W. y Hugget, A. (1997). "Induction and reversal of long-term potentiation by repeated high-frequency stimulation in rat hippocampal slices". **Hippocampus**, 7(2): 137-45.
- Adams, B.; Sazgar, M.; Osehobo, P.; Van der Zee, C.E.; Diamond, J.; Fahnestock, M.; Racine, R.J. (1997a). "Nerve growth factor accelerates seizure development, enhances mossy fiber sprouting, and attenuates seizure-induced decreases in neuronal density in the kindling model of epilepsy". **J. Neurosci.**, 17(14): 5288-5296.
- Adams, B.; Lee, M.; Fahnestock, M.; Racine, R.J. (1997b) "Long-term potentiation trains induce mossy fiber sprouting". **Brain Res.**, 14(775): 193-197.
- Aggleton, J.P.; Blindt, H.S.; Rawlins, J.N. (1989). "Effects of amygdaloid and amygdaloid-hippocampal lesions on object recognition and spatial working memory in rats". **Behav. Neurosci.**, 103(5): 962-974
- Aggleton, J.P.; Keith, A.B.; Rawlins, J.N.; Hunt, P.R.; Sahgal, A. (1992). "Removal of the hippocampus and transection of the fornix produce comparable deficits on delayed no-matching to position by rats". **Behav. Brain Res.**, 52:61-71
- Amaral, D. y Witter, M. (1995). "Hippocampal formation", en Paxinos, G. (ed)., **The Rat Nervous System**. Academic: Australia.
- Amaral, D. y Dent, J. (1981). "Development of the mossy fibers of the dentate gyrus: I. A light and electron microscopic study of the mossy fibers and their expansions". **J. Comp. Neurol.**, 195:51-86.
- Andrade, J.P.; Castanheira Vale, A.J.; Paz Días, P.G.; Madeira, M.D.; Paula Barbosa, M.M. (1996). "The dendritic trees of neurons from the hippocampal formation of protein-deprived adult rats. A quantitative Golgi study". **Exp. Brain Res.**, 109(3): 419-33
- Andrade, J.; Madeira, M.D.; Paula-Barbosa, M. (1995). "Evidence of reorganization in the hippocampal mossy fiber synapses of adult rats rehabilitated after prolonged undernutrition". **Exp. Brain Res.** 104: 249-261.
- Andrade, J.; Lima-Andrade, M.; Paula-Barbosa, M. (1993). "Maintenance of the cell loss in the hippocampal formation of adult rats after recovery from lengthy low-protein administration". **Eur. J. Neurosci.**, [Suppl. 6]:100.
- Aniksztejn, L.; Roisin, M.; Represa, A; Ben-Ari, Y. (1991). "Trends in LTP research", en Baudry, M. y Davis, J. (eds). **Long-Term Potentiation**. MIT Press: USA.
- Artola, A. y Singer, W. (1990). "The involvement of N-methyl-D-aspartate receptors in induction and maintenance of long-term potentiation in rat visual cortex". **Eur. J. Neurosci.**, 2: 254-269.
- Auer, R.N.; Jensen, M.L.; Whishaw, I.Q. (1989). "Neurobehavioral deficit due to ischemic brain damage limited to half of the CA1 sector of the hippocampus". **J. Neurosci.**, 9(5): 1641-1647.

- Bailey, C. H., y Kandel, E. R. (1993). "Structural changes accompanying memory storage". **Annu. Rev. Physiol.**, 55: 397-426.
- Bear, M. y Kirkwood, A. (1993). "Neocortical long-term potentiation". **Curr. Opin. Neurobiol.**, 3: 197-202.
- Becker, C.; Artola, A; Gerardy-Shan, Becker, T, Weitz, H, Schachner, M. (1995). "Removal of polysialic acid impairs spatial learning and hippocampal long term potentiation". **Soc. Neurosci. Abstr.** Vol. 21, Part 1, p. 28, No. 20.3.
- Becker, C.; Artola, A; Gerardy-Shan, R; Becker, T; Wezl, H; Schachner, M. (1996). "The polysialic acid modification of the neural cell adhesion molecule is involved in spatial learning and hippocampal long-term potentiation". **J. Neurosci. Res.**, 45:143-152.
- Becker, J; Walker, J; Olton, D. (1980). "Neuroanatomical bases of spatial memory". **Brain Res.** 200: 307-320.
- Bedi, K. (1991). "Effects of undernutrition during early life on granule cell numbers in the rat dentate gyrus". **J. Comp. Neurol.**, 311(3): 425-33.
- Ben-Ari, Y. y Gho, M. (1988). "Long-lasting modification of the synaptic properties of rat CA3 hippocampal neurones induced by kainic acid". **J. Physiol.** 404: 365-384.
- Ben-Ari, Y. y Represa, A. (1990). "Brief seizure episodes induce long-term potentiation and mossy fibre sprouting in the hippocampus". **TINS.**, 13(8): 312-318.
- Bernabeu, R.; Berilaqua, L; Ardenghi, P; Bromberg, E; Schmitz, P; Bianchin, M; Izquierdo, I; Medina, J. (1997). "Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats". **PNAS**, 94(13): 7041-6.
- Bernasconi-Guastalla, S.; Wolfer, D.; Lipp, H. (1994). "Hippocampal mossy fibers and swimming navigation in mice: correlations with size and left-right asymmetries". **Hippocampus**, 4(1):53-64.
- Bliss, T. y Løvmø, T. (1973). "Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path". **J. Physiol.**, 232:331-356.
- Bors, D. y Forrin, B. (1996). "The effects of post-weaning environment, biological dam, and nursing dam on feeding neophobia, open field activity, and learning". **Can. J. Exp. Psychol.**, 50(2):197-203.
- Bryan, G. y Riesen, A. (1989). "Deprived somatosensory-motor experience in stump-tailed monkey neocortex: dendritic spine density and dendritic branching of layer IIIB pyramidal cells". **J. Comp. Neurol.**, 288:208-217.
- Buchs, P. y Muller, D. (1996). "Induction of long-term potentiation is associated with major ultrastructural changes of activated synapses". **PNAS**, 93(15): 8040-8045.
- Buresova, O. y Bures, J. (1979). "Extinction of a newly acquired conditioned taste aversion: effect of gustatory CS administered under anesthesia". **Behavioural Processes**, 4: 329-339.
- Burgess, N. y O'Keefe, J. (1996). "Neuronal computations underlying the firing of

- place cells and their role in navigation". **Hippocampus**, 6(6): 749-762.
- Cavazos, J.E.; Golarai, G.; Sutula, T.P. (1991). "Mossy fiber synaptic reorganization induced by kindling: time course of development, progression, and permanence". **J. Neurosci.**, 11(9): 2795-2803.
- Cintra, L.; Díaz Cintra, S.; Galván, A.; Kemper, T.; Morgane, P.J. (1990). "Effects of protein undernutrition on the dentate gyrus in rats of three age groups". **Brain Res.**, 532:271-277.
- Cintra, L.; Granados, L.; Aguilar, A.; Kemper, T.; DeBassio, W.; Galler, J.; Morgane, P.; Duran, P.; Díaz Cintra, S. (1997). "Effects of prenatal protein malnutrition on mossy fibers of the hippocampal formation in rats of four age groups". **Hippocampus**, 7(2): 184-191.
- Collier, T. J. y Routtenberg, A. (1984). "Selective impairment of declarative memory following stimulation of dentate gyrus granule cells: a naloxone-sensitive effect". **Brain Res.**, 310(2): 384-7.
- Collier, T. J.; Quirk, G.J.; Routtenberg, A. (1987). "Separable roles of hippocampal granule cells in forgetting and pyramidal cells in remembering spatial information". **Brain Res.**, 409(2): 316-28.
- Conquet, F.; Bashir, Z.; Davies, C.; Daniel, H.; Ferraguti, F.; Bordi, F.; Fraz-Bacon, K.; Reggiani, A.; Matarese, V.; Cordé, F.; Collingridge, G.; Crépel, F. (1994). "Motor deficit and impairment of synaptic plasticity in mice lacking mGluR1". **Nature**, 372:237-243.
- Cragg, B. G. (1975). "The density of synapses and neurons in normal, mentally defective and aging human brains". **Brain**, 98: 81-90.
- Danschel, G. (1981). "Histochemical demonstration of heavy metals". **Histochemistry**, 71:1-16.
- De Lanerolle, N.C.; Kim, J.; Robbins, R.; Spencer, D. (1989). "Hippocampal interneuron loss and plasticity in human temporal lobe epilepsy". **Brain Res.** 495:387-395.
- Debanne, D.; Gähwiler, B.H.; Thompson, S.M. (1996). "Cooperative interactions in the induction of long-term potentiation and depression of synaptic excitation between hippocampal CA3-CA1 cell pairs in vitro". **PNAS**, 93(29): 11225-30.
- DeBassio, W. A.; Kemper, T.L.; Galler, J.R.; Tonkiss, J. (1994). "Prenatal malnutrition effect on pyramidal and granule cell generation in the hippocampal formation". **Brain Res. Bull.**, 35(1):57-61.
- Derrick, B.E.; Weinberger, S.B.; Martínez, J.L. Jr. (1991). "Opioid receptors are involved in an NMDA receptor-independent mechanism of LTP induction at hippocampal Mossy Fiber-CA3 Synapses". **Brain Res. Bull.**, 27:219-233.
- Derrick, B.E.; Rodríguez, S.B.; Lieberman, D.N.; Martínez, J.L. Jr. (1992). "Mu opioid receptors are associated with the induction of hippocampal mossy fiber long-term potentiation". **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 263(2): 725-733.
- Desmond, N. y Levy, W. (1988). "Anatomy of associative long-term synaptic modification". **Long-term potentiation: from biophysics to behavior**. Alan R. Liss: E.U. pp. 265-305.
- Diamond, M.; Lindner, B.; Raymond, A. (1967). "Extensive cortical depth

- mesasurements and neuron size increases in the cortex of environmentally enriched rats." **J. Comp. Neurol.**, 131:357-364.
- Díaz-Cintra, S.; García Ruiz, M.; Corkidi, G.; Cintra, L. (1994). "Effects of prenatal malnutrition and postnatal nutritional rehabilitation on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of four ages". **Brain Res.** 662(1-2): 117-26.
- Doyere, V.; Srebro, B.; Laroche, S. (1997). "Heterosynaptic LTD and depotentiation in the medial perforant path of the dentate gyrus in the freely moving rat". **J. Neurophysiol.**, 77(2): 571-8.
- Ebert, U. y Loscher, W. (1995). "Differences in mossy fibre sprouting during conventional and rapid amygdala kindling of the rat". **Neurosci. Lett.** 190: 199-202.
- Emerich, y Walsh, (1989). "Ganglioside AFG2 prevents the cognitive impairments and cholinergic cell loss following intraventricular colchicine". **Exp. Neurol.**, 112(3): 328-337.
- Escobar, M.L.; Russell, R.W.; Booth, R.A.; Bermúdez-Rattoni, F. (1994a) "Accelerating behavioral recovery after cortical lesions. I. Homotopic implants plus NGF". **Behav. Neural. Biol.**, 61(1):73-80.
- Escobar, M.L.; Barea-Rodríguez, E; Reyes, J; Derrick, B; Martinez, J. (1994b). "Synaptogenesis induced by hippocampal mossy fiber long-term potentiation". **Soc. Neurosci. Abstr.**, 551.18, p. 1343
- Escobar, M.L.; Barea Rodríguez, E.J.; Derrick, B.E.; Reyes, J.A.; Martínez, J.L. Jr. (1997). "Opioid receptor modulation of mossy fiber synaptogenesis: independence from long-term potentiation". **Brain Res.** 751: 330-335.
- Escobar, M.L.; Chao, V.; Bermúdez-Rattoni, F. (1998). "In vivo long-term potentiation in the insular cortex: NMDA receptor dependence". **Brain Res.**, 779: 314-319.
- Escorihuela, R.; Fernández-Teruel, A.; Tobeña, A.; Vivas, N.; Mármol, F.; Badía, A.; Dierssen, M. (1995). "Early environmental stimulation produces long-lasting changes on beta-adrenoreceptor transduction system". **Neurobiol. Learning and Memory**, 64:49-57.
- Falkenberg, T.; Mohammed, A.; Henriksson, B.; Persson, H.; Winblad, B.; Lindebrs, N. (1992). "Increased expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat hippocampus is associated with improved spatial memory and enriched environment". **Neurosci. Lett.**, 138:153-156.
- Fiala, B. A.; Joyce, J.; Greenough, W. (1978). "Environmental complexity modulates growth of granule cell dendrites in developing but not adult hippocampus of rats". **Exp. Neurol.**, 59: 372-383.
- Franck, J.E.; Pokorny, J.; Kunkel, D.D.; Schwarzkroin, P.A. (1995). "Physiologic and morphologic characteristics of granule cell circuitry in human epileptic hippocampus". **Epilepsia**, 36(6): 543-558.
- Gaarskjaer, F. (1986). "The organization and development of the hippocampal mossy fiber system". **Brain Res. Rev.**, 11:335-357.
- Gall, C. (1993). "Seizure-induced changes in neurotrophin expression: implications for epilepsy". **Experimental Neurol.**, 124: 150-166.
- Hebb, D. (1949). **The organization of behavior**, NY: John Wiley.

- Hoffman, K; Murray, B; Bahr, B. (1995). "Adhesion molecules & hippocampal plasticity: evidence that a selective, delayed change in neural cell adhesion molecule-180 (NCAM-180) is associated with LTP mechanisms". **Soc. Neurosci. Abs.**, Vol. 21, Part 2, No. 523.11, p. 1323.
- Houser, C.R.; Miyachiro, J.; Suvartz, B.; Walsh, G.; Rich, J.; Delgado-Escueta, A. (1990). "Altered patterns of dynorphin immunoreactivity suggest mossy fiber reorganization in human hippocampal epilepsy". **J. Neurosci.** 10:267-282.
- Johnston, H. M. y Morris, B. J. (1994). "Induction of c-fos gene expression is not responsible for increased proenkephalin mRNA levels in the hippocampal dentate gyrus following NMDA stimulation". **Mol. Brain Res.**, 25(1-2): 147-50.
- Kamphuis, W.; Smirnova, T.; Hicks, A.; Hendriksen, H.; Mallet, J.; Lopes da Silva, F.H. (1995). "The expression of syntaxin 1B/GR33 mRNA is enhanced in the hippocampal kindling model of epileptogenesis". **J. Neurochem.**, 65:1974-1980.
- Kempermann, G.; Kuhn, H.G.; Gage, F.H. (1997). "More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment". **Nature**, 386(6624): 493-5.
- Khrestchatsky, M.; Ferhat, L.; Charton, G.; Bernard, A.; Pollard, H.; Represa, A.; Ben-Ari, Y. (1995). "Molecular correlates between reactive and developmental plasticity in the rat hippocampus". **J. Neurobiol.** 26(3):426-436.
- Killakey, H. (1995). "The formation of a cortical somatotopic map". **TINS**, 18:402-407.
- Kleim, J.; Lussnig, E.; Schwarz, E.; Comery, T.; Greenough, W. (1996). "Synaptogenesis and FOS expression in the motor cortex of the adult rat after motor skill learning". **J. Neurosci.**, 16(14): 4529-4535.
- Lasalle, J.; Bulman-Fleming, B.; Wahlsten, D. (1991). "Hybrid vigour and maternal environment in mice. II. Water escape learning, open field activity and spatial memory". **Behav. Processes**, 23:35-45.
- Lashley, K.S. (1950). "In search of the engram". **Symp. Soc. Exp. Biol.** 4:454-482.
- Lemos, T. y Cavalheiro, E. A. (1995). "Suppression of pilocarpine-induced status epilepticus and the late development of epilepsy in rats". **Exp. Brain Res.**, 102(3): 423-8.
- Lipp, H.P.; Schwegler, H.; Crusio, W.E.; Wolfer, D.P.; Leisinyer-Trigora, M.; Heimrich, B.; Driscoll, P. (1989). "Using genetically-defined rodent strains for the identification of hippocampal traits relevant for two-way avoidance behavior: a non-invasive approach". **Experientia**, 45: 845-859.
- Martínez, J. y Derrick, B. (1996). "Long-term potentiation and learning". **Ann. Rev. Neurosci.**, 47:173-203.
- McConnell, J.V. (1962). "Memory transfer through cannibalism in planarians". **J. Neuropsychiatry**, 3(suppl. 1): 542-548.
- Meck, W.H.; Church, R.M.; Olton, D.S. (1984). "Hippocampus, time and memory". **Behav. Neurosci.**, 98:3-22.
- Meck, W. (1988). "Hippocampal function is required for feedback control of an

- internal clock's criterion". **Behav Neurosci.**, 102(1):54-60.
- Milner, B.; Corkin, S.; Teuber, H. (1968). "Further analysis of the hippocampal amnesic syndrome: 14-year follow-up of H. M.". **Neuropsychologia**, 6: 215-234.
- Mitsuno, K.; Sasa, M.; Ishihara, K.; Ishikawa, M.; Kikuchi, H. (1994). "LTP of mossy fiber-stimulated potentials in CA3 during learning in rats". **Physiol. Behav.**, 55(4): 633-638.
- Mogensen, J. (1991). "Influences of the rearing conditions on functional properties of the rat prefrontal system". **Behav. Brain Res.**, 42:132-142.
- Morris, R. (1989). "Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning in rats and blockade of long-term potentiation *in vivo* by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5". **J. Neurosci.**, 9(9):3040-3057.
- Morris, R. (1981). "Spatial localization does not require the presence of local cues". **Learning and Memory**, 12:239-260.
- Morris, B. y Johnston, H. (1995). "A role for hippocampal opioids in long-term functional plasticity". **TINS**, 18(8):350-355.
- Morris, B.J.; Feasey, K.J.; ten Bruggencate, G.; Herz, A.; Holt, V. (1988). "Electrical stimulation *in vivo* increases the expression of proenkephalin mRNA and decreases the expression of prodynorphin mRNA in rat hippocampal granule cells". **PNAS**, 85: 3226-3230.
- Nicoll, R. A. y Malenka, R. C. (1995). "Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus". **Nature**, 377(6545): 115-8.
- Okazaki, M.M.; Evenson, D.A.; Nadler, J.V. (1995). "Hippocampal Mossy Fiber Sprouting and Synapse Formation After Status Epilepticus in Rats: Visualization After Retrograde Transport of Biocytin". **J. Comp. Neurol.**, 352: 515-534.
- O'Keefe, J. (1976). "Place units in the hippocampus of the freely moving rat". **Exp. Neurol.**, 51:78-109.
- Olsen, G.M.; Scheel-Kruger, J.; Moller, A.; Jensen, L.H. (1994). "Does neuronal damage of CA1 relate to spatial memory performance of rats subjected to transient forebrain ischemia?". **Acta Neurol. Scand.**, 89:204-209.
- Olton, D.S.; Meck, W.H.; Church, R.M. (1987). "Separation of hippocampal and amygdaloid involvement in temporal memory dysfunctions". **Brain Res.**, 404:180-188.
- Olton, D. y Feustle, W. (1981). "Hippocampal function required for nonspatial working memory". **Exp. Brain Res.**, 41: 380-389.
- Olton, D. y Papas, B. (1979). "Spatial memory and hippocampal function". **Neuropsychologia**, 17:669-682.
- Pavlov, I. P. (1927). **Conditiones Reflexes. An investigation of the physiological activity of the cerebral cortex.** New York: Oxford University Press.
- Paylor, R.; Morrison, S.; Rudy, J.; Waltrip, L.; Wehner, J. (1992). "Brief exposure to an enriched environment improves performance on the Morris water task and increases hippocampal cytosolic protein kinase C activity in young

- rats". **Brain Res.**, 52:49-59.
- Paxinos, G. y Watson, C. (1982). **The rat brain in stereotaxic coordinates**. San Diego, CA: Academic Press.
- Pollard, H.; Khrestchatsky, M.; Moreau, J.; Ghilini, G.; Ben-Ari, Y.; Represa, A. (1994). "Correlation between reactive sprouting and microtubule protein expression in epileptic hippocampus". **Neuroscience**, 61(4):773-787.
- Ramón y Cajal, S. (1889). "Conexión general de los elementos nerviosos", **La medicina práctica**, citado en Finger, S. **Origins of Neuroscience**, Oxford: Oxford University Press, 1994.
- Represa, A. y Ben-Ari, Y. (1992). "Kindling is associated with the formation of novel mossy fibre synapses in the CA3 region". **Exp. Brain Res.**, 92:69-78.
- Represa, A.; Jorguera, I.; LeGal La Salle, G.; Ben-Ari, Y. (1993). "Epilepsy induced collateral sprouting of hippocampal mossy fibers: does it induce the development of ectopic synapses with granule cell dendrites?". **Hippocampus**, 3(3): 257-268.
- Represa, A.; Niguét, J.; Pollard, H.; Khrestchatsky, M.; Ben-Ari, Y. (1994). "From Seizures to Neo-Synaptogenesis: Intrinsic and Extrinsic Determinants of Mossy Fiber Sprouting in the Adult Hippocampus". **Hippocampus**, 4(3): 270-274.
- Robain, O.; Barbin, G.; Billette de Villemeur, T.; Jardin, L.; Jahchan, T.; Ben-Ari, Y. (1994). "Development of mossy fiber synapses in hippocampal slice culture". **Dev. Brain Res.**, 80:244-250.
- Roberts, L.A.; Large, C.H.; O'Shaughnessy, C.T.; Morris, B.J. (1997). "Long-term potentiation in perforant path/granule cell synapses is associated with a post-synaptic induction of proenkephalin gene expression". **Neurosci. Lett.**, 227(3): 205-8.
- Rosenblum, K.; Meiri, N.; Dudai, Y. (1993). "Taste memory: the role of protein synthesis in gustatory cortex". **Behav. Neural Biol.**, 59(1): 49-56.
- Rusakov, D.A.; Davies, H.A.; Harrison, E.; Diana, G.; Richter-Levin, G.; Bliss, T.V.; Stewart, M.G. (1997). "Ultrastructural synaptic correlates of spatial learning in rat hippocampus". **Neuroscience**, 80(1): 69-77.
- Rudy, J. y Sutherland, R. (1989). "The hippocampal formation is necessary for rats to learn and remember configural discriminations". **Behav. Brain Res.**, 34:97-109.
- Saito, S.; Kobayashi, S.; Ohashi, Y.; Igarashi, M.; Komiya, Y.; Ando, S. (1994). "Decreased synaptic density in aged brains and its prevention by rearing under enriched environment as revealed by synaptophysin contents". **J. Neurosci. Res.**, 39:57-62.
- Schwegler, H.; Mueller, G.G.; Crusio, W.E.; Szemes, L.; Seress, L. (1993). "Hippocampal morphology and spatially related behavior in Long-Evans and CFY rats". **Hippocampus**, 3(1): 1-8.
- Sherrington, C.S. (1947). **The integrative action of the nervous system**, citado en Kandel, E. et al. (eds). **Principles of Neural Science**, Amsterdam: Elsevier, 1991.
- Speakman, A. y O'Keefe, J. (1987). "Single unit activity in the rat hippocampus

- during a spatial memory task". **Exp. Brain Res.**, 68:1-27.
- Spurzheim, J. (1825). **Phrenology, or the doctrine of the mind**, citado en Kandel, E. et al. (eds.), **Principles of Neural Science**, Amsterdam: Elsevier, 1991.
- Squire, L. (1987). **Memory and Brain**. Oxford: Oxford University Press.
- Squire, L. y Zola-Morgan, S. (1991). "The medial temporal lobe memory system". **Science**, 253:1380-1386.
- Squire, L. (1992). "Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans". **Psych. Rev.**, 99(2):195-231.
- Sutherland, R. y McDonald, . (1990). "Hippocampus, amygdala and memory deficits in rats". **Behav. Brain Res.**, 37(1):57-79.
- Sutula, T.; He, X.X.; Cavazos, J.; Scott, G. (1988). "Synaptic reorganization in the hippocampus induced by abnormal functional activity". **Science**, 239:1147-1150.
- Terman, G. W.; Wagner, J.J.; Chavkin, C. (1994). "Kappa opioids inhibit induction of long-term potentiation in the dentate gyrus of the guinea pig hippocampus". **J. Neurosci.**, 14(8): 4740-7.
- Teyler, T. J. (1991). "Memory: Electrophysiological Analogs". **Learning and Memory**, NY: Academic.
- Tsumoto, T. (1992). "Long-term potentiation and long-term depression in the neocortex". **Prog. Neurobiol.** 39: 209-228.
- Turner, A. y Greenough, W. (1985). "Differential rearing effects on rat visual cortex synapses I. Synaptic and neuronal density and synapses per neuron". **Brain Res.**, 329:195-203.
- Ungar, G. (1971). "Bioassays for the chemical correlates of acquired information." En: E. J. Fjordingstad (ed.), **Chemical Transfer of Learned Information**, Amsterdam: North-Holland.
- Van der Zee, C.; Rashid, K.; Le, K.; Moore, K.; Stanisiz, J.; Diamond, J.; Racine, R.; Fahnestock, M. (1996). "Intraventricular administration of antibodies to nerve growth factor retards kindling and blocks mossy fiber sprouting in adult rats". **J. Neurosci.**, 15(7):5316-5323.
- Volkmar, F. y Greenough, W. (1972). "Rearing complexity affects branching of dendrites in the visual cortex of the rat". **Science**, 176:1445-1447.
- Volpe, B.T.; Davis, H.P.; Towle, A.; Dunlap, W.P. (1992). "Loss of hippocampal CA1 pyramidal neurons correlates with memory impairment in rats with ischemic or neurotoxin lesions". **Behav. Neurosci.**, 106(3): 457-464.
- Wahisten, D.; Lasalle, J.D.; Bulman-Fleming, B. (1991). "Hybrid vigour and maternal environment in mice III. Hippocampal mossy fibres and behaviour". **Behavioural Processes**, 23:47-57.
- Walsh, R. N.; Budtz-Olsen, O.; Penny, J.; Cummings, R. (1969). "The effects of environmental complexity on the histology of the rat hippocampus". **J. Comp. Neurol.**, 137: 361-366.
- Wang, J. H. y Stelzer, A. (1996). "Shared calcium signaling pathways in the induction of long-term potentiation and synaptic disinhibition in CA1 pyramidal cell dendrites". **J. Neurophysiol.**, 75(4): 1687-702.

- Weiler, I.J.; Hawrylak, N.; Greenough, W.T. (1995). "Morphogenesis in memory formation: synaptic and cellular mechanisms". **Behav. Brain Res.**, 66:1-6.
- Whishaw, I. y Tomie, J. (1991). "Rats with fibria-fornix lesiona can aquire and retain a visual-tactile transwitching (configural) tasks". **Behav. Neurosci.**, 109(4):607-612.
- Winocur, G. y Moscovitch, M. (1990). "Hippocampal and prefrontal cortex contributions to learning and memory: analysis of lesion and aging effects on maze learning in rats". **Behav. Neurosci.**, 104(4):544-551.
- Wood, E.R.; Mumby, D.G.; Pinel, J.P.; Phillips, A.G. (1993). "Impaired object recognition memory in rats following ischemia-induced damage to the hippocampus". **Behav. Neurosci.** 107(1): 51-62.
- Wong, C. (1997). "A brain model with the circuit to convert short-term memory into long-term memory". **Med. Hypotheses**, 48:221-226.
- Wuarin, J. y Dudek, E. (1996). "Electrographic seizures and new recurrent excitatory circuits in the dentate gyrus of hippocampal slices from kainate-treated epileptic rats". **J. Neurosci.**, 16(4):4438-4448.