

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO
FACULTAD DE PSICOLOGÍA

CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN SOSTENIDA DE ARC
COMO UN EVENTO RELEVANTE PARA LA CONSOLIDACIÓN DE
LA MEMORIA ESPACIAL

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN PSICOLOGÍA

PRESENTA

ALEJANDRA ARAFAT ANGULO PERKINS

DIRECTOR DE TESIS
DR. VÍCTOR RAMÍREZ-AMAYA

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
UNAM- JURQUILLA
MÉXICO, 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Índice:

Resumen.....	3
Capítulo 1	
De las neuronas a la conducta.....	4
Capítulo 2	
Plasticidad sináptica: los cambios en la comunicación entre neuronas.....	14
Capítulo 3	
Las moléculas de la plasticidad: de la actividad neuronal a la	
Trascrición de genes.....	24
Capítulo 4.	
El hipocampo y el giro dentado; sus eventos plásticos y su papel en la	
formación de la memoria.....	31
Planteamiento del problema.....	44
Metodología.....	46
Resultados.....	54
Discusión.....	61
Bibliografía.....	67

Resumen:

La memoria puede entenderse como un mecanismo adaptativo de los organismos a los continuos cambios en el ambiente; este mecanismo permite mantener un equilibrio entre el organismo y su medio a través de una continua interacción. El cómo se suscita esta interacción ha sido una larga tarea para muchas disciplinas, entre ellas la Psicofisiología. Partimos de la idea de que el aprendizaje y la memoria son procesos cerebrales complejos, y su establecimiento depende de estructuras y circuitos neuronales implicados en la adquisición y formación de la memoria, como el hipocampo. Se entiende que la experiencia produce cambios en la comunicación de las células del sistema nervioso central (aprendizaje) y que estos pueden ser duraderos o no. A estos cambios se les denomina plasticidad sináptica. La memoria es un fenómeno que depende de que estos cambios se den y se establezcan en el sistema nervioso. La memoria aporta un sustrato de información constante, al organismo, que le permite interactuar con el medio. La memoria explícita, así como la espacial están relacionadas con el sistema hipocampal. Los mecanismos que dan lugar a la plasticidad sináptica son un conjunto de eventos moleculares que se disparan en las neuronas que se activan a consecuencia de eventos conductuales. De ellos, la expresión de genes y la regulación de proteínas, son mecanismos estudiados por su relación con formas persistentes de plasticidad sináptica que se considera subyacen a la formación de la memoria a largo plazo. En este trabajo nos centramos en la expresión de un gen llamado *Arc*, el cual es un gen efector de expresión inmediata (Lahanan A; Worley P., 1998), que se induce a través de la actividad neuronal. Se presume que este gen es importante para los cambios plásticos estructurales por su interacción con proteínas del citoesqueleto y se ha demostrado que está relacionado con el escalamiento sináptico, el cual es un mecanismo plástico que permite mantener los cambios en la eficiencia sináptica a largo plazo. Previamente se había encontrado que, después de una exploración, *Arc* se expresa de manera sostenida en el giro dentado del hipocampo. En el presente trabajo caracterizamos dicho fenómeno y demostramos mediante una estrategia histológica que la presencia duradera del gen esta relacionada a una transcripción sostenida del mismo y caracterizamos parcialmente el curso temporal de la transcripción sostenida de este gen, lo que parece durar alrededor de 8 horas. En la discusión se sugiere la posibilidad de que la permanencia a largo plazo de la proteína de *Arc* este relacionada con el proceso de consolidación de memoria espacial.

Capítulo 1. De las neuronas a la conducta

En Psicología se pueden reconocer históricamente dos enfoques para explicar la conducta: uno en el que se enfatiza la importancia de las variables ambientales como determinantes de la conducta y se considera que la interacción del medio con el organismo es instructiva; este enfoque se conoce como conductista y estudia la relación estímulo-respuesta. En el otro, la conducta se estudia de la mano de ciencias como la Biología, la Anatomía y la Fisiología, es decir, partiendo del principio de que el sustrato biológico es inherente a la conducta. El interés está en entender el papel que juega el sistema nervioso como el responsable de dar origen a la conducta. Por su parte, la escuela conductista al eliminar especulaciones que considera subjetivas como el concepto de los "procesos mentales", por considerarlos no observables e independientes a las cuestiones "propias" de la conducta, asume que el sistema nervioso juega un papel pasivo.

El problema de la aproximación conductual es que al intentar abandonar la especulación de lo que ocurre en relación a los "procesos mentales" niega la inminente participación del sustrato biológico que subyace a la conducta, limitando su estudio a un solo nivel de análisis, el de la descripción de la conducta, lo que nos aleja de la posibilidad de generar una explicación integral del problema; la cual debiera de incluir otros niveles de análisis como el de los algoritmos de procesamiento, los substratos anatómicos y fisiológicos del funcionamiento del sistema nervioso, además de la descripción detallada de las variables conductuales que, finalmente, deberán generar una explicación que satisfaga los conceptos a todos los niveles, incluyendo la experiencia del hombre común (Marr, 1945).

La idea de satisfacer por medio de diversas aproximaciones científicas los diferentes niveles de análisis no permeó en la escuela conductual, probablemente por considerar que los "procesos mentales" eran inaccesibles para su estudio científico. Esta visión probablemente tenía cierta validez a principios de los años 40, por las limitantes metodológicas de la época, pero el desarrollo de las neurociencias modernas, que ha sido notablemente acelerado en los últimos años, nos permite estudiar tanto el sustrato estructural, como los detalles de los mecanismos celulares que dan lugar a la actividad neuronal. Esto nos permite entender cómo y con qué funciona el órgano que da lugar al procesamiento de la

información proveniente de los estímulos. Esta idea se puede resumir en la expresión de Barlow (1972):

“El pensamiento se construye por medio de la actividad de las neuronas y no debiéramos utilizar frases como: la actividad neuronal refleja o monitorea los procesos de pensamiento. Porque la actividad de las neuronas simplemente es en si misma el proceso de pensamiento.”

Al asumir lo anterior, el estudio de la conducta queda vinculado necesariamente con el estudio de la actividad neuronal y el producto de ella. Para algunos, la actividad neuronal genera una representación de la realidad y para otros esta actividad es en si misma el proceso de conocimiento. Estas dos concepciones biológicas, cuyas diferencias pudieran considerarse sutiles, empero fundamentales, serán discutidas en adelante con el propósito de entender los elementos que cada una de ellas aporta para al estudio del problema cognitivo que nos atañe en el presente trabajo, que se trata de la formación de la memoria espacial.

Los dos enfoques que tomaremos para este estudio servirán de apoyo y para cotejar al mismo tiempo los principios de estudio con los que se rigen, y finalmente ver si convergen; aunque lo importante es que cada uno revelará distintos aspectos del aprendizaje, los cuales detallaremos adelante. Las posturas son: la representacionista y la que llamaremos no-representacionista.

El sistema nervioso puede ser visto como un instrumento a través del cual el organismo obtiene información del ambiente, para así construir una representación del mundo. Lo anterior implica que hay una interacción entre el organismo y el estímulo, y que el sistema nervioso funciona como un órgano que permite el ingreso y procesamiento de la información entrante a través de nuestros sentidos (Marr, 1945). Esta postura representacionista, se ha construido desde la gestalt, y posteriormente se ha desarrollado de manera detallada con las aportaciones de teóricos como Hebb (1949), Marr (1976), McNaughton (1996) y Sakurai (1999) entre otros. Esta postura es probablemente la que predomina actualmente en las neurociencias modernas; en ella existe una base racional para postular que la función neuronal es el procesamiento de los estímulos y la generación de una interpretación o representación de ellos en base a un sistema formal de codificación basado en la actividad de las células nerviosas.

La diferencia entre la postura representacionista y la no-representacionista, radica principalmente en las reglas de acción que modifican el estímulo y por ende la respuesta conductual. Este otro enfoque, surge de los trabajos hechos por Maturana y Varela, en el que se ve al sistema nervioso como un sistema determinado como una red de interacciones neuronales circulares; esta red de elementos interconectados capaces de cambios estructurales son o constituyen la historia del acoplamiento estructural (definiendo "acoplamiento estructural" como "adaptaciones" en términos de la Biología clásica). Por lo que en esta visión, la información no esta preestablecida, no se adquiere del medio a través de representaciones, sino que esa información implica necesariamente regularidades que son producto de las actividades cognitivas, las cuales son la actividad neuronal en interacción constante con el medio. Esto difiere sutilmente de lo planteado por Barlow, en el sentido de que no contempla como una posibilidad la actividad neuronal, como un proceso cognitivo aislado de la interacción con el medio. En otras palabras lo endógeno y lo exógeno se definen mutuamente. De esta forma, el sistema nervioso constituye el elemento principal en la relación entre el medio y el organismo donde el resultado es el fenómeno de "cognocere", acuñado por Varela. Esta postura es planteada por Maturana, Varela, Oyama, entre otros; que buscan dar un salto hacia una perspectiva en mayor contacto con el organismo, tomando en cuenta que el sistema nervioso está sublevado al mantenimiento del organismo (Maturana y Varela, 1994), esta es una de las reglas de acción en las que se distingue de la postura representacionista, que bajo la perspectiva de la Biología clásica, propone que este fenómeno está sublevado al mantenimiento de la especie, no del organismo en particular.

Para la postura no-representacionista, el funcionamiento básico de cualquier organismo (con o sin sistema nervioso), implica un metabolismo celular, lo que quiere decir que sus componentes moleculares están dinámicamente relacionados en una continua red de interacciones. Es interesante cómo este metabolismo, que en bioquímica no es otra cosa que "la suma total de los procesos químicos que toman lugar en las células" (Alberts, et al. 1994), forma los componentes que integran al organismo (la membrana, los organelos, los genes y sus proteínas, etc...) dando como resultado estructuras que regulan el funcionamiento interno.

Esta postura, sugiere como una generalidad en cualquier organismo, la organización (relaciones entre sus componentes), la cual lo autodefine como una unidad autónoma o, como una unidad homeostática y, dentro de esta autonomía,

la preservación del organismo es lo esencial, mientras que para la Biología clásica, el objetivo principal es la preservación de la especie.

La preservación del organismo implica la conservación de su identidad, la cual, aunada a la invariancia de sus relaciones, son la base de cualquier transformación ontogenética y evolutiva (Maturana y Varela, 1994). La homeostasis o metabolismo celular está comprendido en las dos corrientes que contemplamos, es decir, ambas posturas reconocen esta autonomía del organismo para mantener un estado de equilibrio dinámico, a través de un conjunto de mecanismos que tienden a alcanzar una estabilidad en las propiedades de su medio interno, y por lo tanto, de la composición bioquímica de los líquidos, células y tejidos, para mantener la vida (del organismo y de la especie). Con lo anteriormente mencionado inferimos que, a nivel molecular las propuestas parten de un punto en común al considerar la existencia de una tendencia al equilibrio, en el ambiente interno y en su relación con el medio. Por lo tanto, toda la organización estructural y funcional de los seres tiende hacia un equilibrio dinámico. Esta característica de dinamismo, en la que todos los componentes están en constante cambio para mantener dentro de unos márgenes el resultado del conjunto (frente a la visión clásica de un sistema inmóvil), es un punto de coincidencia entre los dos enfoques, pues lo distinguen como una importante característica del ser vivo.

Además de un metabolismo, existe una organización en el organismo que, podemos describir como un patrón o configuración. Esta organización es por lo tanto un mecanismo de constitución de identidad. En el proceso de constitución de identidad, se advierte una circularidad o red de producciones metabólicas (como la producción de una membrana que posibilite dicha red, entre otras). En palabras de Maturana:

"Esta circularidad fundamental es por lo tanto una autoproducción única de la unidad viviente a nivel celular. El término autopoiesis designa esta organización mínima de lo vivo. Toda organización autopoietica, ocurre no sólo en términos de su estructura físico-química, sino que también en tanto unidad organizada, esto es, en referencia a su identidad autoproducida." (Maturana y Varela, 1994).

Podemos decir que esta propuesta sugiere que el sistema nervioso funciona en conjunto con el organismo, es decir, como una totalidad, pues todos sus elementos, la manera en la que éstos se organizan y los diferentes dominios -

como el aprendizaje y la memoria-, tienen un común denominador: ser fenómenos de transformación del sistema nervioso, que subyacen a los cambios conductuales. De acuerdo a Maturana y Varela estos cambios en la conducta, tienen lugar para la manutención de la autopoiesis (arriba descrita) del organismo mismo; mientras que para la Biología clásica y la corriente representacionista, la acción del sistema nervioso es integral, puesto que funciona como un todo, la diferencia en la óptica representacionista, radica en que el sistema nervioso es importante por su papel en la adaptación del organismo y la supervivencia de la especie.

En la posición no-representacionista, se enfatiza la particularidad de la morfología de las células nerviosas y su organización, basada en una red de correlaciones senso-efectoras con acoplamientos específicos, pero más importante aún, es la manera en que dicha red se implementa mediante cambios en las características funcionales de las neuronas y las conexiones (Maturana y Varela, 2003).

Haciendo un breve recuento de los puntos que hasta ahora hemos reconstruido, sabemos que uno de los principios del funcionamiento de todo organismo es su autonomía homeostática, basada en el metabolismo celular; también sabemos que lo anterior implica un acoplamiento estructural o adaptación (el vocablo depende de que corriente se tome) que, se da a través de una interacción constante entre el organismo y el medio (equilibrio dinámico); por último, tenemos que el sistema nervioso y su organización estructural (sus componentes y la relación particular entre ellos), se encuentran insertos en un organismo que de igual forma se rige por las mismas leyes de funcionamiento, es decir que, el sistema nervioso, se define como un tejido de células peculiares que participa (con "clausura operacional" en términos de Maturana) en la regulación y el mantenimiento de un organismo, nunca de manera independiente; y que la Psicología biológica define como intervención somática (Rosenzweig, et al. 2001)

Ahora, de qué manera la conducta (comer, correr, aprender, etc.) se relaciona o mejor dicho participa como agente regulador del substrato biológico, resulta interesante y complejo. De inicio, comencemos por definir a la conducta como la descripción que un observador hace de los cambios de estado que un sistema presenta con respecto a un medio al compensar las "perturbaciones", (o información, estimulación o como se le quiera llamar), que de éste recibe (Maturana y Varela, 1994). De esta manera, el sistema nervioso no tiene como función inventar la conducta, sino expandir las posibilidades de interacción ante alteraciones endógenas y exógenas, es decir, si el sistema nervioso amplía el

campo (por su intervención en todo el organismo) y el número (por la tremenda proliferación de neuronas y tipos de neuronas) de las posibles correlaciones senso-efectoras, no sólo entre las superficies sensoriales y las superficies motoras del organismo, -como fue en su inicio, dentro de la historia filogenética de los seres vivos- sino entre variados tipos de neuronas o tejidos especializados, que pueden o no culminar en una acción motora.

Resumiendo, tenemos dos aspectos principales en los que el sistema nervioso participa en los fenómenos cognoscitivos: el primero implica su papel en la ampliación del dominio de interacciones del organismo, es decir, despliega un abanico de posibles estados en el organismo, lo que es resultado de la vasta diversidad de configuraciones neuronales entreveradas que, para Maturana y Varela, es la clave de su participación en el operar del organismo; el segundo es que provee al organismo de nuevas dimensiones de acoplamiento estructural o adaptación, dado que gracias a él, es factible la asociación de un sin número de estados internos con la diversidad de interacciones en que éste puede entrar. Por lo anterior, podemos atrevernos a decir que el sistema nervioso hace posible: más dominios de interacción y más dimensiones de acoplamiento estructural o adaptación. En el caso del hombre esto se refiere a la posibilidad de un lenguaje, de la autoconciencia (conducta en el dominio de la autoobservación) y el aprendizaje, por ejemplo (Maturana y Varela, 2003).

Por lo tanto, el aproximarnos al entendimiento psicológico del sistema nervioso necesariamente implica el estudio de su dinámica interna, de sus cambios estructurales y de su relación con el medio, como lo plantea la Fisiología, pues, remitirnos al estudio de la memoria, como es el caso del presente trabajo, sin tomar en cuenta los mecanismos que le subyacen o relegando la importancia de éstos, sería negar automáticamente nuestra identidad como seres vivos y como humanos.

Después de este breve análisis de los mecanismos de acción bajo los que trabaja el sistema nervioso en su operar con el medio, constatamos que las dos corrientes (la representacionista y la no-representacionista) dan descripciones interesantes de estos mecanismos y, aunque sólo se han descrito sus planteamientos respecto al operar del sistema nervioso, a lo largo del trabajo añadiremos datos relevantes que nos ayuden en la comprensión del aprendizaje como fenómeno, de manera tal que, ambas posturas nos enriquezcan. Cabe mencionar que será más extenso y diverso el aporte teórico que incluiremos con relación a la corriente

representacionista debido pues cuenta con abundante trabajo experimental, basado en los métodos de la Biología clásica, en los que se describe en detalle los procesos biológicos que dan lugar al procesamiento de la información, lo que incluye, entre otras cosas, eventos importantes que estudiamos en este trabajo como son la transcripción de genes y su traducción a proteínas.

Dentro del representacionismo como modelo teórico de investigación, existen aproximaciones al estudio de estos mecanismos neuronales que han culminado en nociones muy completas acerca del funcionamiento del sistema nervioso y de muchos de sus elementos de manera más particular, resultando en excelentes observaciones acerca del acoplamiento del organismo y el medio.

En el estudio de la formación de la memoria, las investigaciones hechas desde el siglo XIX ya conjeturaban que ciertos cambios en las neuronas y sus conexiones podrían constituir un mecanismo de almacenamiento de recuerdos (Ramón y Cajal, 1893). En 1906 Sherrington, propuso su teoría de la sinapsis y en ella agregó un apartado en el que planteó lo siguiente:

“privada de toda oportunidad de reproducirse a sí misma y de aumentar su número mediante mitosis o de otra manera, la célula nerviosa dirige su energía reprimida hacia la amplificación de sus conexiones con sus compañeras, en respuesta a los sucesos que la estimulan. De ahí que sea capaz de una educación desconocida en los otros tejidos”.

Desde Ramón Cajal hasta los programas de investigación actuales, esta teoría se ha relacionado con la formación de la memoria y pone énfasis en la importancia de la flexibilidad de las conexiones para establecer o modificar los patrones de actividad que se generan en los circuitos neurales.

En la teoría de representación de la información, se considera que la función principal del sistema nervioso es procesar información, es decir, transformarla en un sistema formal de representación o código basado en la actividad de las neuronas. La actividad neuronal se establece en patrones, formando circuitos neuronales. Los grupos de neuronas se organizan de una forma que les permite mantener y repetir, a lo largo del tiempo, los patrones de actividad que se generaron con la estimulación. La organización de las neuronas que forman un grupo, no implica de forma necesaria una disposición espacial ordenada, dado que, pueden estar distantes unas de las otras. Por lo anterior se propone que organizar

y mantener de la capacidad de generar patrones de actividad (incluso en ausencia del estímulo), depende inicialmente de la reverberación o repetición del patrón de actividad y posteriormente, de cambios en la comunicación entre sus elementos, es decir que, para mantener la respuesta a largo plazo, debe de suscitarse un cambio significativo que modifique las conexiones sinápticas entre los miembros del circuito.

En 1949 el Psicólogo Donald O. Hebb, denominó ensamblajes neuronales al establecimiento de redes neuronales relativamente complejas. Así mismo, el ensamblaje de neuronas estará encargado de representar la información, es decir, de aludir a cierta información y de mantenerla. Ahora bien, de qué manera el sistema nervioso central (SNC) forma ensamblajes que reflejan el cambio en la comunicación interneuronal, queda expresado de la siguiente forma:

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

El postulado de Hebb (mencionado arriba), representa la primera propuesta explícita de que los cambios en la eficiencia de las conexiones sinápticas, serían los responsables de estabilizar la respuesta de los ensamblajes, para permitir el establecimiento de los patrones de actividad a largo plazo y así consolidar la información, es decir, formar una memoria.

Actualmente, la gran mayoría de los neurocientíficos aceptan la noción de que la representación de la información se da por medio de patrones de actividad que se repiten en grupos de células nerviosas, en gran parte se debe a las aportaciones de modelos matemáticos de redes neuronales (Marr, 1976), que junto con las perspectivas teóricas de los neurocientíficos cognitivos como Sakurai (1999), McNaughton (1996), entre otros; han definido las propiedades que determinan el funcionamiento de los ensamblajes, o lo que se conoce también como el código poblacional, que se enuncia abajo:

El traslape: una misma neurona puede participar en múltiples ensamblajes.

Codificación escasa: un ensamblaje se codifica con la menor cantidad de neuronas posible para maximizar la capacidad de almacenamiento.

Construcción y reconstrucción dinámica: las conexiones sinápticas entre los miembros del ensamble son siempre flexibles.

Persistencia dinámica: el patrón de actividad que se genera en un ensamble tendera a persistir mediante la reactivación de los elementos sinápticos de las unidades neuronales que lo componen.

Completamiento dinámico: la reactivación de un subgrupo de neuronas del ensamble o de un subgrupo de ensambles de una secuencia de fase, suficientemente grandes, darán lugar a la reactivación de todo el ensamble o la secuencia de fase.

La noción hebbiana de ensamble reconoce todos los aspectos que lo definen, pues logra la convergencia de dos teorías aparentemente opuestas: la teoría localizacionista o frenológica, que destaca el "lugar" o los grupos de neuronas activadas como lo importante lo que sugiere de manera peligrosa una rigidez estructural; y la teoría de campo y equipotencialidad de Lashley (1937), que desde otro extremo, otorga mayor importancia al patrón de actividad, lo cual no da cabida al concepto de plasticidad sináptica dado que relega a la estructura.

Hebb reconoció las dos posturas anteriores como verdaderas, y en su trabajo las integró en una perspectiva más panorámica, en la que el patrón es importante siempre y cuando se repita (mediante la reverberación, por ejemplo) la actividad de ese grupo particular de neuronas (lugar). Además, propuso que las secuencias de fase (actividad coordinada de varios ensambles) como él las denominó, serían la base de los conceptos o significados de la información que se está analizando, por lo que el tiempo que perdure el ensamble determinaría el tiempo que perdure la memoria. Aunado a lo anterior, no sólo propuso el concepto de ensamble, sino también el de constructo neural; un constructo neural resulta de una secuencia de fase, que a su vez es consecuencia de la integración coordinada de varios ensambles, que en conjunto da lugar a algo apartado del estímulo o perturbación desencadenadora; y que representa la base de la formación de conceptos o las imágenes propias de los estímulos.

Debemos recordar que la organización del sistema nervioso (en ensambles o constructos neurales) conlleva una funcionalidad para él (todas las células que lo componen); y para el organismo (persona, perro, rata...) en general. ¿Cuál es esa funcionalidad?, de acuerdo con las teorías que revisamos (representacionista y no-representacionista) no es otra cosa que la manutención del equilibrio o acoplamiento estructural de cada neurona, pues al repetirse la actividad en esas

neuronas, éstas se fortalecen mediante cambios en la comunicación entre dichas neuronas, es decir, en sus contactos sinápticos, que a su vez nos habla de la posibilidad de un cambio estructural en la célula. ¿Qué implicaría ese cambio estructural?, de manera inicial, indica que el SNC es un sistema en continuo remodelado estructural, por lo tanto, plástico; para los investigadores Maturana y Varela este remodelado implica lo siguiente:

"...la presencia de esta plasticidad se traduce en que el sistema nervioso, al participar mediante los órganos sensoriales y efectores en los dominios de interacción del organismo que seleccionan su cambio estructural, participa en la deriva estructural de éste con conservación de su adaptación."

Concluyendo, hemos mencionado los principios más elementales del funcionamiento básico del sistema nervioso en su operar con el medio; también, esbozamos el cómo es que se establecen o alteran circuitos neurales para atender a determinada información; y finalmente, mencionamos dos posturas en las ciencias cognitivas que atienden a estos cuestionamientos: por un lado tenemos a la representación como interpretación, es decir, que la cognición en el organismo se da a partir de codificaciones de la información del medio; y por el otro, la postura no-representacionista, planteada por la escuela de Maturana y Varela, que sostiene que la cognición es la historia del acoplamiento estructural o adaptaciones que el organismo presenta, y que hacen emerger una configuración particular, es decir, definida por la interacción entre el organismo, en sus posibilidades de cambio, y la fenomenología del medio, lo que concluye en no reconocer propiamente el concepto de representación, sino una acción productiva desarrollada por estrategias evolutivas que compensan las "perturbaciones". Lo importante de estos dos enfoques es que los dos buscan esclarecer las diferentes dimensiones de la cognición, los dos contribuyen; incluso existen paralelismos entre ellos, como el que en ambos casos se reconoce: a) la modificación o remodelado estructural del sistema nervioso, b) la modificación se da como consecuencia de la continua interacción del organismo con el medio; y c) reconocen el establecimiento de un proceso, se le llame "cognocere" o estabilización de la representación.

Capítulo 2. Plasticidad sináptica: los cambios en la comunicación entre neuronas

Una de las propiedades más importantes del sistema nervioso que nos permite entender cómo se lleva a cabo la formación de la memoria y el establecimiento de nuevas conductas, es la capacidad de modificación de las características en la comunicación entre los elementos de la red neuronal. Esta propiedad la sugirieron originalmente Ramón y Cajal (1894), Lorente de Nó (1949) y Sherington (1906). Sin embargo, fue Hebb (1949) quien generó una propuesta detallada y explícita acerca del valor que la plasticidad puede tener para el establecimiento de la información en forma de representaciones que se mantienen a largo plazo, como se mencionó en el capítulo anterior.

En 1890 William James caracterizó la plasticidad como:

"la posesión de una estructura débil suficiente para provocar una influencia, pero lo bastante fuerte para no provocarla enseguida. [...] El tejido nervioso parece estar dotado de un extraordinario grado de plasticidad de este tipo; de modo que podemos, sin dudar, formular nuestra primera proposición como sigue: los fenómenos del hábito en los seres vivos se deben a la plasticidad de los materiales orgánicos de los que su cuerpo se compone".

Actualmente sabemos que James tenía razón, sin embargo, se quedó corto en cuanto a la capacidad plástica que él creía posible. Por ejemplo, se ha demostrado que los cambios plásticos que ocurren en la estructura de las espinas dendríticas, que al parecer están en constante movimiento, ocurren en cuestión de minutos (Fischer, et al., 1998).

Los cambios plásticos en la comunicación sináptica dan lugar a modificaciones en la eficiencia sináptica, en las características estructurales de la conexión e incluso pueden incrementar o disminuir el número de elementos sinápticos disponibles, así como también, pueden añadir o eliminar unidades celulares. Sin embargo, todos estos eventos ocurren o se modifican ante diversas circunstancias o parámetros de actividad neuronal.

Para hacer la explicación minuciosa, abordemos de manera puntual los procesos particulares que caracterizan a la plasticidad comenzando por describir uno de los modelos principales de plasticidad sináptica, que se conoce como potenciación a largo plazo (PLP). El neurofisiólogo Timothy Bliss y el psicólogo Terje Lomo en 1973, descubrieron la PLP en el hipocampo del conejo intacto; en su reporte sobre los mecanismos cerebrales de la memoria se describe lo siguiente: La PLP, es un aumento estable y duradero en la magnitud de la respuesta post-sináptica, después de que se han estimulado las vías aferentes mediante la administración de trenes de estimulación eléctrica de frecuencia relativamente alta (Figura 1) (Bliss y Lomo, 1973).

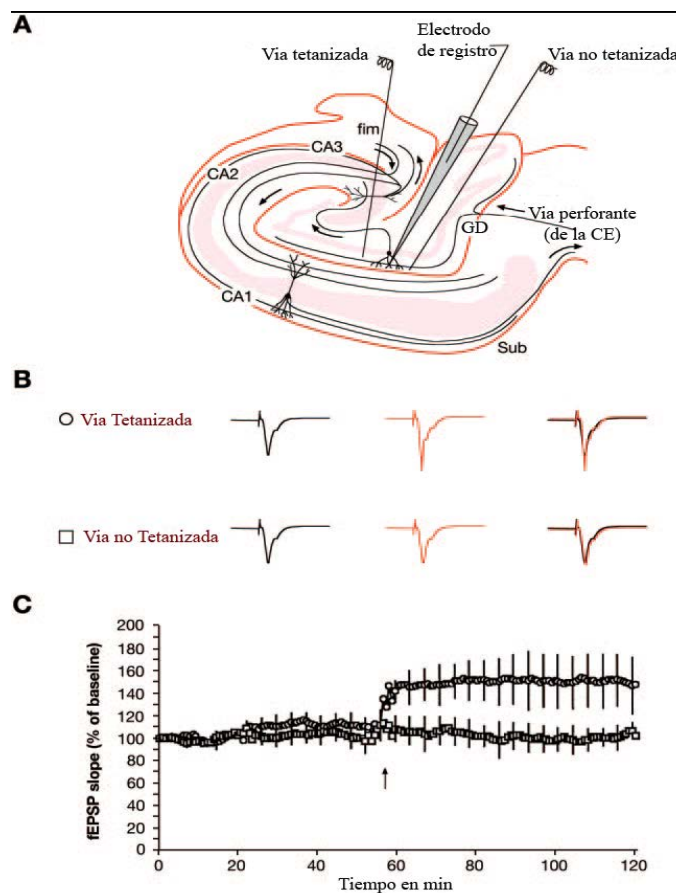


Figura 1. PLP de la vía perforante en el cerebro humano. En A se muestran los sitios anatómicos en donde se estimula con alta frecuencia (vía tetanizada) o con baja frecuencia (vía no tetanizada); la vía perforante y el lugar de registro está localizado en las dendritas de las células granulares del giro dentado. En B se muestran los potenciales post-sinápticos excitatorios (fEPSP por sus siglas en inglés), se puede apreciar el incremento en la amplitud de la respuesta como consecuencia de la tetanización. En C se muestra una grafica de las variaciones de la pendiente del potencial post-sináptico excitatorio a lo largo del tiempo, antes y después de la tetanización (marcada con la flecha) de la vía perforante. La respuesta se mantiene aumentada a lo largo del tiempo, sin mostrar decaimiento (Modificado de Cooke y Bliss, 2006).

Las conexiones sinápticas tienen la capacidad de promover un incremento en su eficiencia sináptica (tipo PLP), pero también pueden disminuirla. A este otro mecanismo se le conoce como depresión a largo plazo o DLP, éste supone una

disminución duradera en la magnitud de la respuesta post-sináptica excitatoria de las neuronas, que se da después de que células aferentes hayan sido activadas por estímulos eléctricos de frecuencia relativamente baja (Bliss y Lomo, 1973). Por lo tanto, la PLP y la DLP permiten que cada célula realice una especialización de la respuesta ante la entrada de información proveniente de una vía, y determina si el disparo de ésta será parte o no, de los patrones de actividad que se dan en un circuito o ensamble neuronal ante un evento de estimulación particular. Ambos mecanismos le otorgan identidad a cada estímulo a través de la modificación de la respuesta de un grupo de células nerviosas, de tal manera que, al final, cada estímulo se representa por un patrón de actividad característico en un grupo particular de células; y así cada sinapsis incrementa o decrementa su respuesta (PLP y DLP respectivamente) en función del estímulo, por lo tanto, una misma vía debe tener un continuo de generación de LTP y LTD. Bear (1996) señaló que la conexión entre dos células puede cambiar, tanto deprimiéndose como potenciándose; esto ocurre en un continuo (Figura 2) que se puede obtener mediante modelación de la respuesta sináptica, y que se ha demostrado con resultados experimentales en animales.

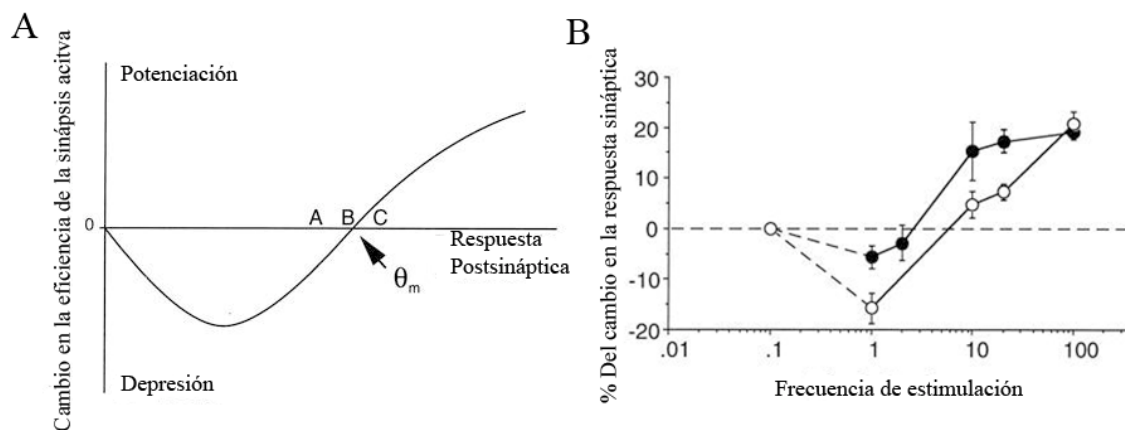


Figura 2. En A modelo de predicción de Cooper en el que se sugiere que debe existir un continuo en la inducción de DLP y PLP; en B se muestran los datos obtenidos de experimentos en la vía hipocámpal de CA1 (círculos blancos) y en vías corticales (círculos negros). La predicción de Cooper, basada en un modelo matemático, ésta valida con los resultados experimentales de Mark Bear (1996). El punto de inflexión de la curva “ θ_m ” es diferente entre la región del CA1 en el hipocampo y la corteza, este es un evento de metaplasticidad que evita la saturación del sistema. (Modificada de Bear, 1996)

Es importante mencionar que los cambios en la eficiencia de la sinapsis presentan importantes características:

Especificidad de vía: una vez inducida la PLP en una sinapsis, ésta no es propagada arbitrariamente a las sinapsis adyacentes, sino que se potencia

específicamente a la vía estimulada. La PLP sólo se propaga a aquellas sinapsis de acuerdo a las reglas de asociación y cooperatividad.

Asociación: se refiere a lo que se observa cuando la estimulación débil de una sola vía es insuficiente para la inducción de PLP, y una fuerte (con alta frecuencia) estimulación simultánea de otra vía induce PLP en ambas vías.

Cooperatividad: la PLP puede ser inducida tanto por la estimulación tetánica alta de una sola vía o una sinapsis, como de manera cooperativa a través una estimulación débil de varias sinapsis. Cuando una vía estimula débilmente una sinapsis, se produce una despolarización insuficiente para producir PLP. En contraste, cuando un estímulo débil es aplicado en muchas vías que convergen en un área de la membrana postsináptica, las despolarizaciones postsinápticas individuales generadas, pueden despolarizar colectivamente la célula postsináptica, lo suficiente para inducir PLP de manera cooperativa. La asociación y la cooperatividad pueden compartir el mismo mecanismo celular subyacente.

La existencia de estas propiedades plásticas en el SNC coincide con la propuesta de acoplamiento estructural (adaptación) de Maturana y Varela, pues, reconocen que estos mecanismos intervienen en la constante transformación microscópica de la red neuronal durante las interacciones del organismo. Y dado que el sistema integra y elimina células del ensamble, lo que tiene como consecuencia natural una experiencia o conocimiento (acción efectiva en el dominio en que se espera una respuesta), dependiente de dichas modificaciones.

Se ha demostrado que la PLP está relacionada con el aprendizaje y la formación de la memoria, dado que la PLP tiende a perdurar por periodos de tiempo en el orden de semanas, lo que se relaciona con la duración de los recuerdos (para una revisión ver Martínez y Derrick, 1996); el bloqueo o inhibición de la PLP impide la adquisición o consolidación de diversas tareas de aprendizaje, o de aquellas que dependen de la estructura en donde se afectó la PLP (Morris, et al., 1986; Martínez y Derrick, 1996).

Es importante mencionar que la PLP se puede dividir en dos mecanismos: el primero, es la inducción y el segundo es el mantenimiento; como veremos en el capítulo 3, cada mecanismo implica diferentes eventos moleculares y celulares, pero es importante mencionar que mientras la inducción se relaciona con la adquisición de una nueva representación o información, el mantenimiento se relaciona con el proceso de consolidación de la memoria. Brevemente, se entiende por consolidación al proceso dinámico mediante el cual la información deja de ser

lábil y se estabiliza en una representación que tenderá a perdurar, es decir, es un proceso mediante el cual la información se convierte en memoria a largo plazo. Este proceso fue originalmente descrito por Muller y Pilzecker en 1900 (ver McGaugh, 2000), en donde mostraron que el aprendizaje no produce de manera instantánea memorias permanentes, sino que éste es un proceso mediante el cual las memorias se fijan (McGaugh, 2000). Precisamente durante este proceso dinámico ocurren eventos moleculares y celulares que permiten mantener o hacer perdurar los cambios plásticos que han ocurrido, como la PLP. En congruencia con esta idea, se ha demostrado que los tratamientos que afectan el establecimiento de la PLP, también afectan la consolidación de la memoria (Riedel, et al., 1995), y recientemente se demostró en un experimento, que el mantenimiento de la PLP es necesario para el mantenimiento de los recuerdos, es decir, que al modificar un evento plástico previamente establecido, también se afecta un recuerdo previamente consolidado (Pastalkova, et al., 2006).

Finalmente, la prueba más contundente de que los mecanismos plásticos como la PLP y la DLP subyacen el aprendizaje y la memoria, es que algunas tareas conductuales inducen cambios en la eficiencia de las sinapsis, semejantes a la PLP, en regiones asociadas con el procesamiento de dicha información (Rogan, et al., 1998; Whitlock, et al., 2007).

Existen varias formas mediante las cuales se lleva a cabo la estabilización del cambio plástico, esto ocurre fundamentalmente por medio de mecanismos metaplásticos o bien mediante cambios en la estructura de las conexiones sinápticas. De estos dos mecanismos hablaremos en enseguida.

Uno de los eventos metaplásticos más importantes y que resulta necesario para la estabilización de la PLP es el escalamiento sináptico. Este tipo de plasticidad se denomina plasticidad homeostática y fundamentalmente consiste en el ajuste, con un sentido reduccionista, de la respuesta post-sináptica de toda la zona dendrítica, en donde previamente ocurrió PLP, lo que permite regular homeostáticamente el cambio en la eficiencia, evitando que la respuesta post-sináptica excitatoria se acerque a sus límites superiores, lo que impide la saturación. Este mecanismo permite que la PLP perdure, sin afectar la capacidad de cambio del resto de la dendrita, y por el contrario, promoviendo la posibilidad de nuevos cambios en otras regiones sinápticas de la dendrita.

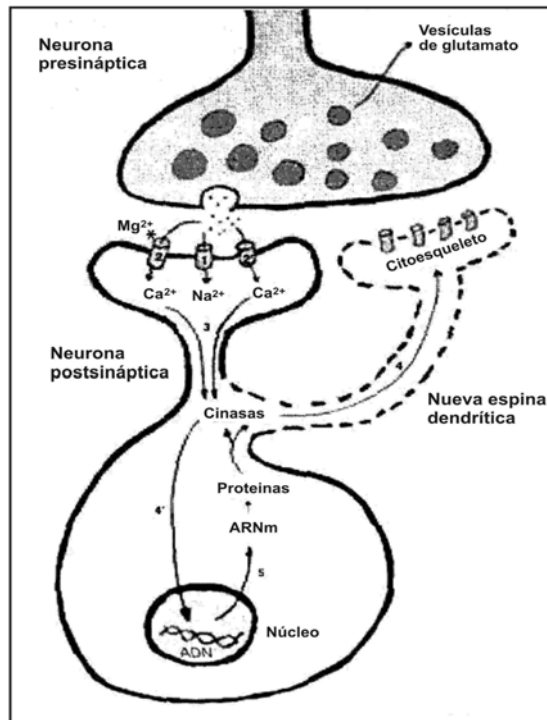


Figura 3. Generación de una nueva región post-sináptica, como un ejemplo de los cambios en la estructura de la sinapsis, que representan otro tipo de cambios plásticos. (Modificada de Morgado, 2005)

Otro de los mecanismos plásticos que se presentan en las neuronas, es el cambio en la estructura de sus conexiones sinápticas. La idea de que la estructura del SNC puede cambiar como un mecanismo subyacente a los procesos cognitivos proviene desde los trabajos de Rosenzweig y colaboradores en los años 60, en donde observaron que los ambientes enriquecidos promovían cambios en ciertos parámetros de la anatomía del SNC (Rosenzweig et al., 1962).

Las evidencias más recientes, muestran que pueden ocurrir cambios en la estructura de las conexiones sinápticas como consecuencia de la experiencia, como lo había predicho Hebb (1949). Se ha demostrado que la inducción de PLP promueve modificaciones notables en la estructura de las espinas dendríticas, las cuales ocurren rápidamente (Toni, et al., 1999) después de la estimulación y se dan de forma progresiva, dando lugar a incrementos en el número de espinas disponibles o a la generación de un mayor número de espinas múltiples; lo anterior correlaciona con las diferentes etapas de mantenimiento de la PLP (Weeks, et al., 1999; 2000; 2001). Después de estimulación para inducir PLP, también se han visto cambios en la estructura que inducen una modificación en el número de contactos sinápticos (Figura 3) (Escobar, et al.; 1999).

Este tipo de cambios plásticos se han observado después de someter a los animales a ambientes complejos que promueven aprendizajes de tipo espacial. En estas condiciones, se han observado incrementos en la densidad de espinas dendríticas en las células piramidales del CA1 (Moser, et al., 1994). Con el uso de métodos modernos de imagenología, se ha observado que la estimulación somato-sensorial modifica la dinámica estructural de espinas dendríticas en las zonas de representación somatosensorial en la corteza del ratón (Lendvai, et al., 2000), esta dinámica estructural ocurre en cuestión de minutos.

Así como se ha observado plasticidad estructural en las zonas post-sinápticas, también se tiene registro de que en ratas con entrenamiento en tareas espaciales se promueve un incremento en la densidad de los botones musgosos, los cuales son terminales de las fibras musgosas de las células granulares del giro dentado (más adelante se detallarán aspectos anatómicos y funcionales de esta estructura), y en el stratum oriens del CA3 (Ramirez-Amaya, et al., 1999; 2001). Esto se ha observado que ocurre en diferentes cepas de ratas e incluso en ratones.

Los cambios en la estructura de las conexiones sinápticas incluyen modificaciones en la estructura del contacto sináptico, como su área de contacto y la forma del mismo, adición o eliminación de espinas, adición o eliminación de terminales axónicas, cambios en la distribución de los contactos (para una revisión ver Chklovskii, et al., 2004) e incluso la adición o eliminación de unidades neuronales en el giro dentado del hipocampo y en el bulbo olfatorio en roedores, (Abrous, et al., 2005).

Lo anterior coincide con otro de los principios que sigue la visión autopoietica:

i) el organismo, incluyendo al sistema nervioso, provee el medio físico y químico para la autopoiesis de las neuronas (y de todas las células), y en consecuencia, es una posible fuente de perturbaciones físicas y químicas que pueden alterar las propiedades de éstas y llevar al organismo a estados (físicos y químicos) que a su vez cambian el estado de actividad del sistema nervioso como un todo, y al actuar sobre las superficies receptoras de algunas de las neuronas componentes, generan nuevos cambios (físicos y químicos) en el organismo generados por modificaciones en el sistema nervioso, y así sucesivamente (Maturana y Varela; 2003).

La teoría de representación de la información, se hace ahínco en los mecanismos que subyacen a la memoria y al aprendizaje, lo que implica básicamente plasticidad neuronal; esta teoría busca dilucidar los diferentes procesos que culminan en la plasticidad, es decir, los detalles de los procesos moleculares que dan lugar a cada uno de los eventos plásticos; (capítulo 3). La cantidad de conocimiento que ha ido construyendo es vasta, y los nuevos trabajos continúan aportando nuevas y valiosas guías que van delimitando el estudio del aprendizaje y la memoria desde esta perspectiva.

La propuesta de Maturana y Varela, propone que la importancia del concepto de plasticidad no está en el hecho de que guarde "engramas" o representaciones del mundo, sino en que implica una continua transformación que permanece congruente con las transformaciones continuas que se suscitan en el medio como resultado de que cada interacción lo afecta en alguna forma. Lo anterior es conocido como aprendizaje adecuado, (Maturana y Varela, 2003) y señala a un mecanismo a través del cual la célula se mantiene acoplada estructuralmente con su entorno, permitiendo que un cambio plástico en el ensamble o circuito neuronal, se mantenga a diferentes plazos temporales, dependiendo de la estabilidad del cambio, y no se concrete como algo permanente e inamovible.

Como podemos darnos cuenta, en el enfoque no-representacionista lo que se realza es que cualquier cambio en la organización del SNC surge de los cambios en algunas de las propiedades de las neuronas que lo componen; lo anterior puede complementarse con los estudios experimentales de la otra perspectiva (representacionista), pues finalmente en ambos enfoques se alude a la idea de que dichos cambios surgen en el acoplamiento del SNC y el organismo a través de su funcionamiento homeostático.

Como se observa, las dos visiones se complementan, pues cada una considera aspectos diferentes de un mismo fenómeno en el organismo; sólo que desde la visión de Maturana y Varela, el aprendizaje como fenómeno no representa ningún aspecto del operar del SNC, sino la descripción hecha por un observador, el cual describe como memoria o aprendizaje los cambios que tienen lugar a lo largo de la ontogenia del organismo como resultado de sus interacciones, es decir que, las representaciones que Hebb propone, Maturana las reconoce pero sólo en el dominio de las descripciones y de la observación, no en el dominio de operación del sistema nervioso.

Capítulo 3. Las moléculas de la plasticidad: de la actividad neuronal a la transcripción de genes

Una pregunta fundamental un gran número de científicos interesados en las neurociencias cognitivas ha intentado responder es: ¿Cómo se generan los cambios plásticos que subyacen el aprendizaje y la memoria? Las respuestas que se han generado representan un cúmulo enorme de conocimiento, por lo que solamente revisaremos los que consideramos más relevantes.

Los eventos de actividad neuronal son los desencadenantes del destino plástico de las conexiones de las células nerviosas. La actividad se produce como consecuencia de la activación de receptores post-sinápticos, probablemente los que más se han involucrado en los procesos de plasticidad neuronal son los receptores glutamatérgicos y los receptores colinérgicos, entre otros también importantes, pero con el fin de delimitar nuestro trabajo los omitiremos.

Los receptores a glutamato son extremadamente abundantes en el SNC y se conocen varios tipos de estos receptores, cuyas funciones varían. Básicamente existen dos grandes tipos, los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs), y los receptores ionotrópicos, éstos se dividen en receptores a kainato, receptores tipo AMPA (α -amino-3-hidroxy-5-metilisoxazole-4-propionico acid) y receptores a NMDA (N-metil d-aspartato). Todos los receptores a glutamato son excitatorios. De particular importancia para los procesos plásticos, el receptor a NMDA, cuyo bloqueo con el uso de fármacos antagonistas, inhibe la inducción de la PLP y la DLP (Martinez y Derrick 1996; Daoudal y Debanne, 2003). Muchos trabajos en la literatura indican que la activación de receptores a NMDA también es importante para el disparo de los mecanismos moleculares de cambios plásticos en la estructura de la comunicación sináptica (para revisión ver Ramírez-Amaya, et al., 2007).

La razón por la cual los receptores a NMDA son importantes detonadores de cambios plásticos es porque éstos, al abrirse, dejan entrar al interior de la célula cantidades importantes de calcio y los flujos de calcio son un evento molecular de los más complejos, que determinan la ocurrencia, o no, de cambios plásticos en las conexiones neuronales (Cavazzini, et al., 2005).

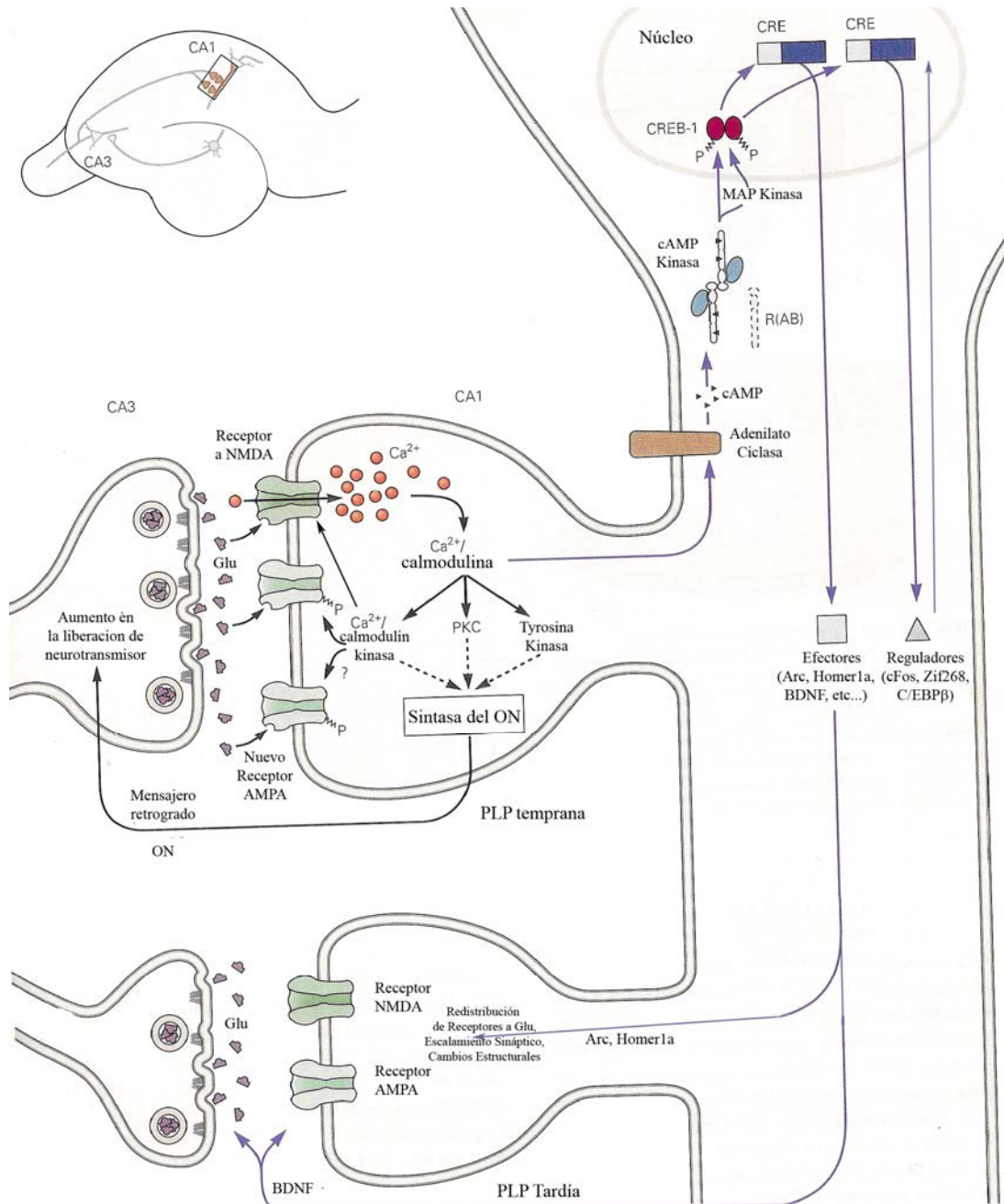


Figura 4. Los eventos moleculares que subyacen los cambios plásticos tempranos y los tardíos (Modificado del Kandel, et al., 2001).

Los eventos moleculares que ocurren como consecuencia de la activación de receptores a NMDA, dan lugar a cambios plásticos tempranos y tardíos (Figura 4). Al activarse los receptores a NMDA se permite la entrada de Ca^{2+} dando lugar a la activación de diferentes quinasas como la CaMKII, PKC, Tyrosina kinasa etc., éstas al activarse fosforilan diferentes proteínas de membrana, entre las que se incluyen los receptores AMPA y NMDA, que al estar fosforiladas modifican sus características funcionales y permiten modificar la eficiencia de la respuesta post-sináptica. Algunas de estas quinasas activan enzimas como la sintasa del ON

(óxido nítrico) generando su expresión, la cual que funciona como mensajero retrogrado que modifica la liberación de neurotransmisor. Todos estos eventos dan lugar a las modificaciones plásticas tempranas, ya que ocurren casi de inmediato y tienden a ser transitorias. Los eventos plásticos tardíos también son regulados por las señales de calcio, pero en este caso, éstas pueden influir sobre la transcripción de genes ya sea por sí mismas (Fields, et al., 2005) o, por medio de la activación de otros sistemas como el AMP cíclico, producto de la actividad de la adenilato ciclasa, la cual funciona como un importante segundo mensajero cuya actividad regula a otras kinasas como la PKA, y éstas regulan la transcripción de genes mediante la activación de factores de transcripción como CREB (Kandel, et al., 2001), el cual es reconocido como uno de los factores plásticos más relevantes, pues regula la transcripción de diversos genes.

Esta descripción pudiera satisfacer la pregunta de cómo se regulan eventos moleculares que dan lugar a los procesos plásticos tardíos, pero existen diversos sistemas que dan lugar a la regulación de muchos genes importantes para la plasticidad. Sin embargo, lo importante es entender que este tipo de mecanismos que regulan la transcripción de genes plásticos.

De los genes que son regulados por actividad celular tenemos dos grandes familias, los genes de expresión inmediata y aquellos cuya transcripción es regulada por otros genes que tienen que ser expresados y traducidos previamente (Lyford et al., 1995). En las últimas décadas, se han caracterizado muchos de los denominados genes de expresión inmediata, utilizando estrategias que toman ventaja de su principal característica, esto es que se inducen por actividad celular independientemente de la síntesis de nuevas proteínas. De esta manera, por medio de la estimulación máxima, se induce su expresión y se consideran genes inmediatos a los que se detectan en presencia de inhibidores de la síntesis de proteínas, como cyclohexamida o anisomisina (Worley, et al, 1990). Por ello, los genes de expresión inmediata son por definición, aquellos cuya transcripción se induce independientemente de la síntesis de nuevas proteínas, algunos de estos genes son: *c-Fos*, *c-Jun*, *Zif268*, *Arc* y *Homer 1^a*, entre otros (Lanahan y Worley, 1998). Los genes de expresión inmediata se dividen en dos familias, los genes inmediatos de regulación transcripcional y los genes inmediatos efectores. Como ejemplo de genes inmediatos de regulación transcripcional están *c-Fos*, *c-Jun* y *Zif268*, cuya función plástica está determinada por la actividad de otros genes cuyas proteínas cumplen importantes funciones, como BDNF entre muchos otros. Los genes de

expresión inmediata efectores están representados por *Homer 1a* y *Arc*; y sus proteínas llevan a cabo importantes funciones plásticas, *Homer 1a* está involucrado en la adición de receptores a glutamato (Fagni, et al., 2002), entre otros mecanismos.

Sin embargo, el gen que nos interesa es *Arc* o *Arg/3.1* (Lyford, et al., 1995; Link, et al., 1995). *Arc*, como le llamaremos en el resto del trabajo, es un gen efector de expresión inmediata (Lahanan y Worley, 1998), lo que significa que *Arc* lleva a cabo una función celular independiente de la regulación de la transcripción de otros genes, lo que lo distingue de genes como *c-Fos* y *c-Jun*. *Arc* se induce en células neuronales a través de actividad eléctrica de alta frecuencia y su promotor es dependiente de calcio y MAPK (Waltereit, et al., 2001). Una característica muy singular es que el ARNm de *Arc* viaja a las regiones activas de las dendritas (Steward, et al., 1998), en donde además de acumularse puede ser traducido localmente (Steward y Worley, 2001; Steward y Schuman 2003), por medio de sistemas poliribosomales localizados en regiones distantes de las dendritas y cercanos a las espinas dendríticas.

El papel de *Arc* en la plasticidad sináptica es muy relevante, diferentes estudios han revelado que la inhibición de la traducción de *Arc*, con oligos antisentido, afecta el mantenimiento del PLP inducido electrofisiológicamente (Guzowski, et al., 2000) o farmacológicamente con el uso de BDNF (Bramham y Messaoudi, 2005); este mismo tratamiento, con un oligo que impide la traducción de *Arc*, afecta claramente la consolidación de tareas conductuales, dependientes de la zona en la que se administro el oligo, como es el caso del hipocampo del cual dependen tareas espaciales (Guzowski, et al., 2000), como lo veremos en el siguiente capítulo. Recientemente esto se ha confirmado con el uso de un "knock out" de *Arc* en ratones (Plath, et al., 2006), los cuales muestran deterioros claros en la consolidación de la memoria a largo plazo en diversas tareas de aprendizaje, como condicionamiento al miedo en un contexto, el condicionamiento aversivo a los sabores, reconocimiento de objetos y el laberinto de agua de Morris (Figura 5 y 6).

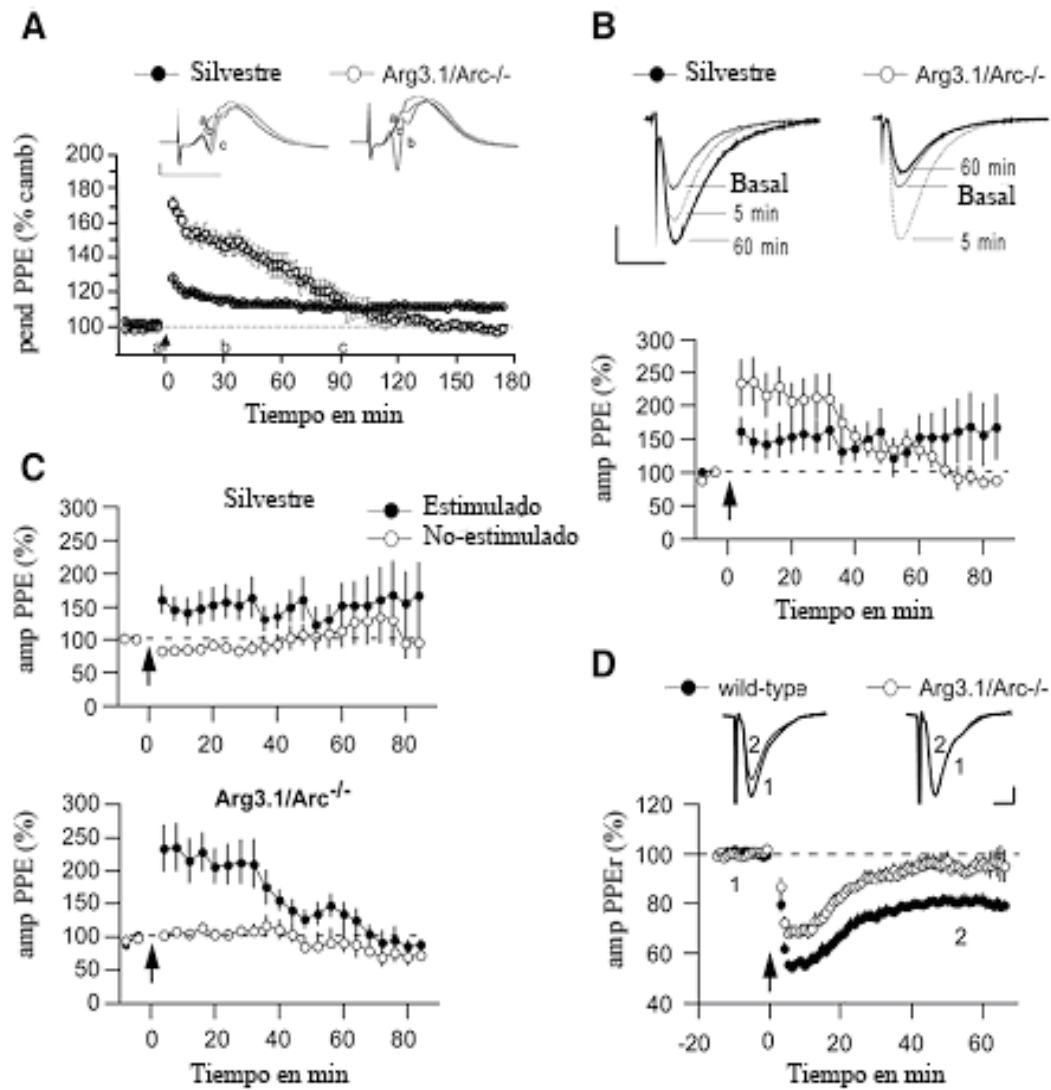


Figura 5. Resultados de la inducción de PLP (A-C) en animales silvestres y el knock out de Arc, nótese que si bien se induce la potenciación esta no perdura. En D se muestran los resultados de la inducción de la DLP comparando el animal “knock out” contra el animal “silvestre” (Modificado de Plath, et al., 2006).

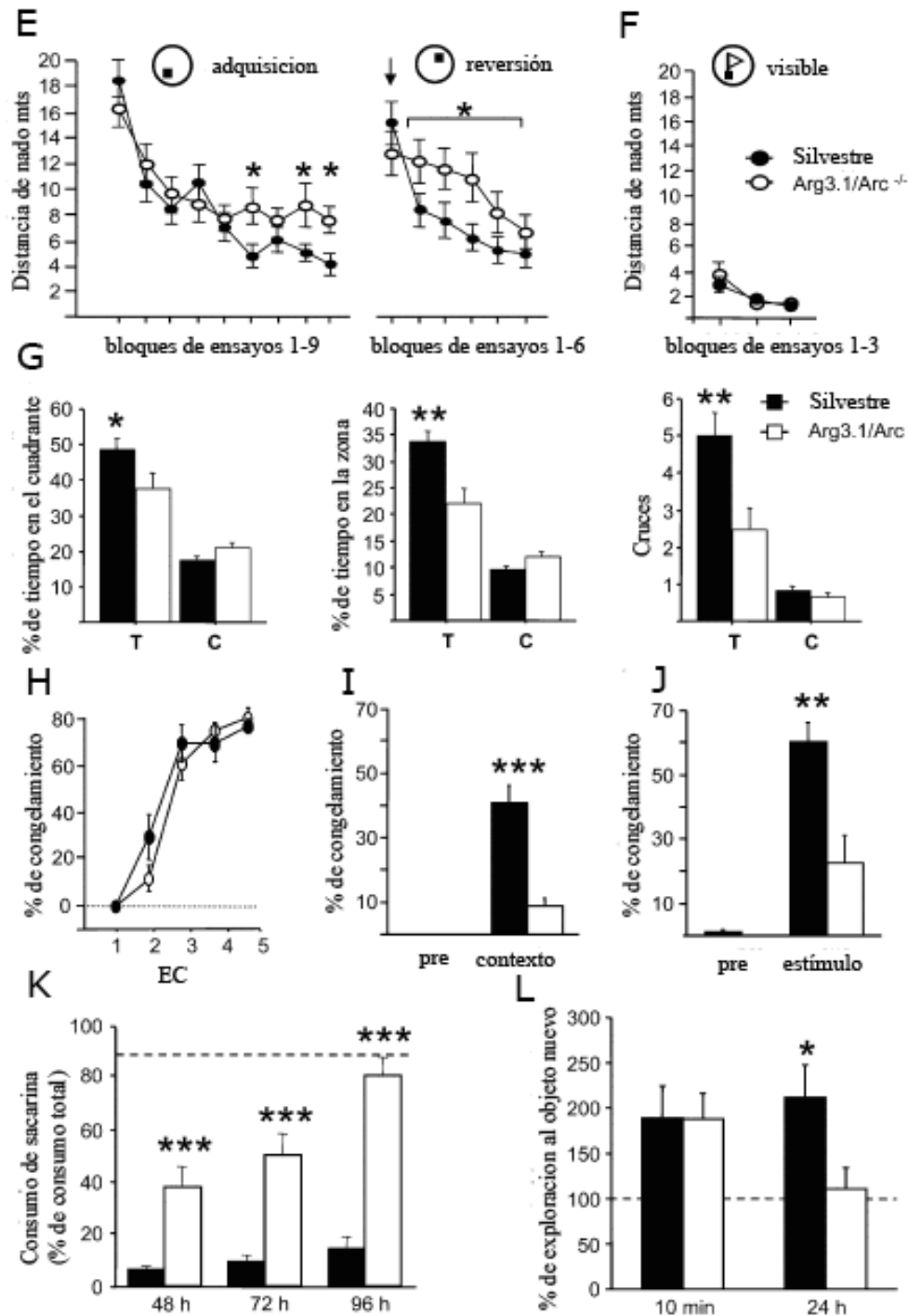


Figura 6. Resultados de la ejecución de los animales “knock out” y los animales silvestres en la tarea de laberinto de agua de Morris (E-G), nótese que si bien los animales aprenden, la ejecución en los últimos días es deficiente y la ejecución en la prueba de memoria está significativamente afectada. En H-J se muestran los resultados en la tarea de condicionamiento al miedo, en donde se ve que en la adquisición (H) la ejecución es similar entre los dos grupos, pero ambas pruebas de memoria, ya sea utilizando el contexto (I), o un estímulo condicionado (J), están afectadas. En K se muestran los resultados del condicionamiento aversivo a los sabores en donde se observa, otra vez, que los animales “knock out” muestran una extinción más rápida de la asociación. Finalmente, en L se muestran los resultados de la tarea de reconocimiento de objetos, en donde los animales “knock out” muestran una ejecución cercana a lo esperado aleatoriamente en la prueba hecha a las 24 horas (Modificado de Plath, et al., 2006).

La forma en la que participa *Arc* como un factor relevante para los cambios plásticos, se conoce parcialmente, por ejemplo, se encuentran los estudios hechos con relación a la secuencia que presenta *Arc*, en los que se ha demostrado que tiene una alta homología con α -espectrina y co-precipita con F-actina (Lyford et al., 1995). Estas moléculas son importantes proteínas del cito-esqueleto, lo que sugiere que *Arc* podría estar relacionado con la plasticidad estructural, particularmente modificando la estructura de las espinas dendríticas, que es donde se localiza (Moga, et al., 2004). En congruencia con esta hipótesis, se ha demostrado en células del neuroblastoma que *Arc* induce el crecimiento de neuritas cuando interactúa con CAMKII (Donai, et al., 2003).

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

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

Capítulo 4. El hipocampo, el giro dentado y el papel de *Arc* en la formación de la memoria espacial

La formación hipocampal es una invaginación del giro parahipocampal en el cuerno inferior del ventrículo lateral, consta de tres regiones: el hipocampo (propriadamente), el giro dentado y el subículum. A su vez el hipocampo, que debe su nombre al vocablo griego *hippokampus* ("caballito de mar"), dado que su forma se asemeja; esta estructura se divide en tres campos llamados cuernos de Ammón 1, 2 y 3 (CA1-CA3). El giro dentado (GD), se divide en banda exterior y banda interior. Ramón y Cajal (1893) describió siete láminas en el hipocampo, pero actualmente sólo se consideran tres diferentes estratos: stratum molecular (stratum lucidum), de células piramidales y stratum *oriens* (capa polimórfica). La población neuronal en el hipocampo incluye a las células piramidales, las células granulares (en el giro dentado), las intrínsecas (células polimórficas, células de canasta), interneuronas gabaérgicas y a las células musgosas.

El circuito hipocampal se considera un circuito tri-sináptico (Figura 7), en donde las células granulares del GD reciben proyecciones de la corteza entorrinal, y las células granulares proyectan hacia las células piramidales del CA3, que a su vez, proyectan a las células piramidales del CA1, y éstas envían eferentes de regreso a la corteza (Gazzaniga, 2000).

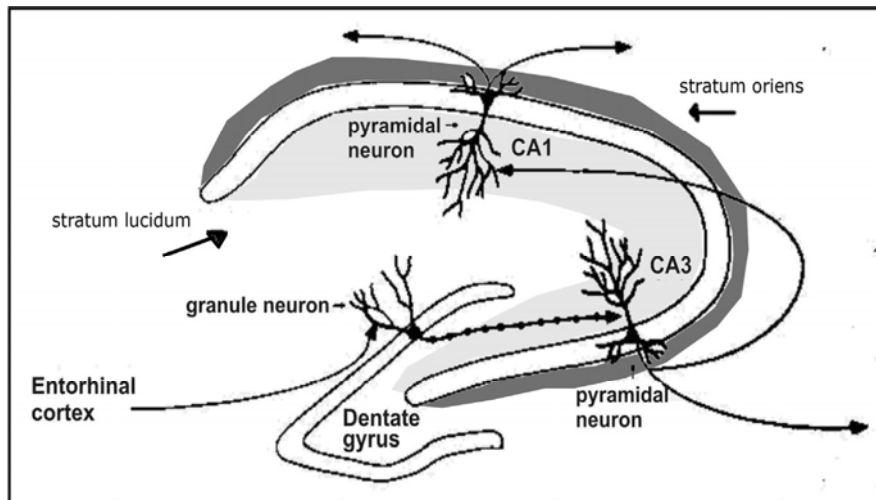


Figura 7. Conexiones del circuito tri-sináptico, donde las células granulares del giro dentado, que reciben proyecciones de la corteza entorrinal, éstas se proyectan vía fibras musgosas a las células piramidales del CA3, para posteriormente proyectarse a las células piramidales del CA1. También se observa la disposición estructural del GD, CA1 y CA3 en la formación hipocampal, (Gazzaniga, 2000). En color gris claro tenemos señalado el stratum lucidum o capa molecular, y en gris oscuro el stratum oriens o capa polimórfica (Modificado de Gazzaniga, 2000).

La noción del circuito tri-sináptico es en general correcta, aunque la conectividad en el hipocampo es notablemente más compleja, por ejemplo, la corteza entorrinal proyecta tanto al GD como a CA3 y CA1, CA3 presenta proyecciones recurrente, lo cual es un característica importante de dicha región, CA1 conecta con el subiculum y también proyecta fibras hacia la corteza entorrinal (Figura 8). Así también, el hipocampo está conectado, directa o indirectamente con diferentes estructuras corticales como la corteza perirhinal y la corteza parahipocampal (McNaughton, et al., 1989; Kandel, et al., 2001; Gazzaniga, 2000).

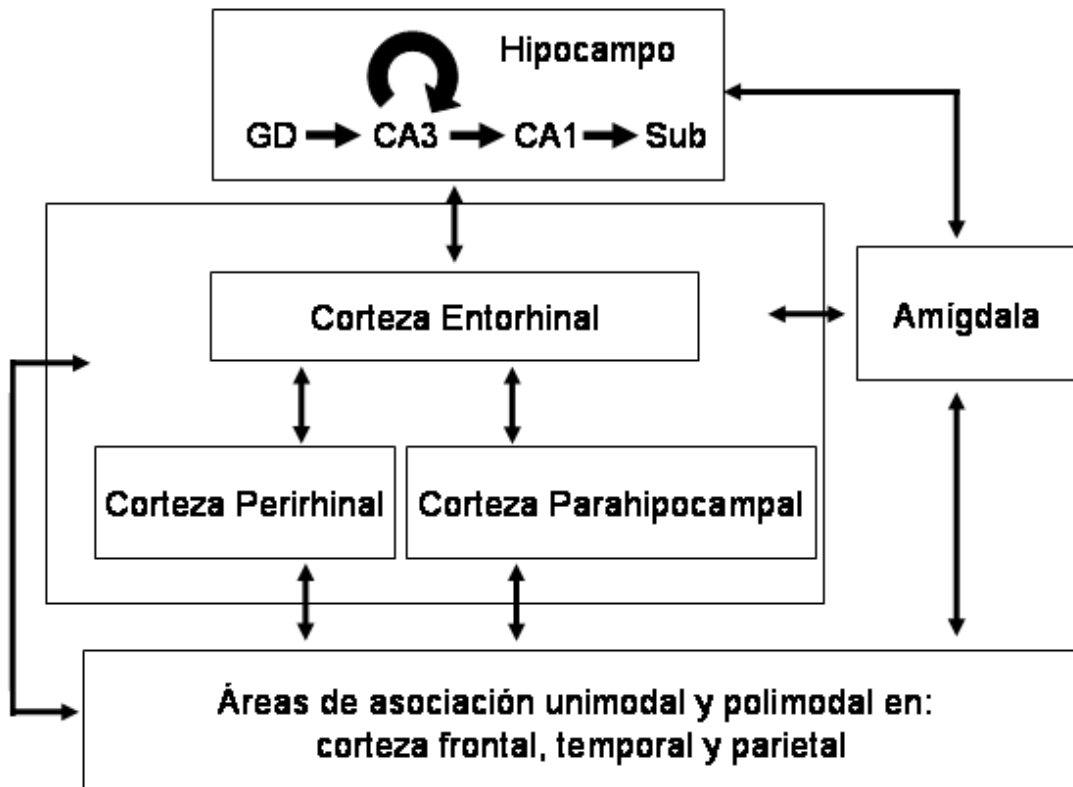


Figura 8. Las diferentes proyecciones, de y hacia el hipocampo, también se observa la conectividad dentro de la formación hipocampal. Cabe señalar que las conexiones entre el hipocampo y el septum no están ilustradas en el diagrama.

El hipocampo es una región altamente plástica, en esta estructura fue donde originalmente se demostró la ocurrencia de PLP, como se mencionó previamente (Bliss y Lomo, 1973), también se ha demostrado plasticidad estructural como el incremento en el número de contactos sinápticos de las fibras musgosas después de manipulaciones experimentales como la inducción de epilepsia (Cavazos y Sutula, 1990), la estimulación que induce PLP (Escobar, 1999) y después del sobre-entrenamiento en una tarea de laberinto de agua (Ramírez-Amaya, et al., 1999; 2001). También se ha descrito incremento en el número de dendritas en animales que habitan en ambientes complejos (Moser, et al., 1994), condición que

les permite ejecutar mejor tareas espaciales. Finalmente, se ha demostrado que en el hipocampo, particularmente en el GD, se generan nuevas neuronas en el animal adulto (Abrous, et al., 2005), las cuales podrían ser relevantes para la memoria (Shors, et al., 2001).

Dadas las características plásticas de esta estructura no es difícil entender porque su preponderante papel en la formación de la memoria. Se tiene claro hoy en día que el hipocampo está relacionado con la formación de memoria explícita (Barco, et al., 2006) que implica el almacenamiento de hechos (memoria semántica) y de eventos (memoria episódica). La memoria episódica se construye a partir de representaciones espaciales y temporales, mientras que la memoria semántica incluye información de significados a la ya construida memoria episódica (Moscovitch M; et al., 2006). Particularmente el papel del hipocampo es formar y almacenar memoria episódica y contribuye a la formación de memoria semántica la cual es almacenada principalmente en la corteza.

El primer ejemplo que reveló la importancia del hipocampo en la formación de la memoria, fue el caso del paciente epiléptico H.M., cuya extirpación bilateral del hipocampo le produjo una amnesia retrógrada graduada temporalmente para la memoria semántica y amnesia retrógrada completa para la memoria episódica (Milner, 1972; Moscovitch, M; et al., 2006) sin embargo lo más sobresaliente fue que mostró un déficit notable para la formación de nuevas memorias tanto episódicas como semánticas.

XXX

El caso de H.M., en el que el proceso de consolidación se ve tremendamente afectado es sólo un ejemplo en donde este mecanismo se puede ver mermado. Existen muchos otros casos semejantes reportados en la literatura (Milner, 2005) y todos ellos confirman la participación del hipocampo en la formación de la memoria episódica.

Un tipo de memoria episódica es la memoria espacial, el hipocampo también se ha relacionado de manera importante con la ejecución de tareas espaciales. O'Keefe y Dostrovsky (1971) demostraron que existen neuronas en el hipocampo que se activan específicamente cuando el animal está en una localización determinada en el espacio. A estas células se les llamó células de lugar, las cuales se consideran como aquellas que presentan un incremento en su tasa de disparo en respuesta a

un lugar específico en el espacio. Las células que presentan características de disparo de células de lugar, son todas las células piramidales de las regiones de CA1, CA3 y las granulares del giro dentado (también se han encontrado células que responde ante estimulación espacial en el subíulum, principalmente a cambios en la dirección de la cabeza y en la corteza entorrinal con múltiples campos receptivos espaciales). Las células de lugar presentan un patrón de encendido que parece ser producto de la interacción del organismo con su medio, es decir, es información significativa para el organismo con relación al espacio en el que se encuentre en dicho momento. Los estudios sugieren que las células que presentan campos receptivos espaciales ("place fields"), al responder en conjunto representan todas ellas el contexto espacial, o bien se puede decir que generan un mapa, como lo habría sugerido Tolman (1948) y como lo interpretaron O'Keefe y Nadel (1978).

Si el contexto espacial cambia, el patrón de disparo del grupo de células que presentó un campo receptivo espacial también será distinto, en estas condiciones, nuevas células responderán, otras dejaran de hacerlo y algunas seguirán respondiendo en ambos ambientes con campos receptivos espaciales diferentes, a esto se le denomina re-mapeo (Muller, 1996). El re-mapeo o re-estructuración del mapa implica la modificación en la respuesta del ensamble de células que respondió a un ambiente inicialmente diferente e implica una constante interacción del organismo y su medio. Así como existe re-mapeo, que consiste en generar un nuevo mapa en un ambiente diferente, también se da la estabilidad de la respuesta de células de lugar cuando el animal es colocado nuevamente en el mismo ambiente las mismas células responden con los mismos campos receptivos (Jeffery y Hayman, 2004; Muller, 1996). Esta capacidad de mantener la respuesta de las células de lugar estable es dependiente de procesos plásticos mediados por receptores a NMDA (ver Shapiro and Eichenbaum, 1999).

Una forma de estudiar la actividad de las células de lugar es por medio de una nueva técnica de imagenología denominada "análisis comportamental de la actividad neuronal temporal, mediante el uso de hibridación *in situ* fluorescente" o "catFISH", por sus siglas en inglés. La técnica de "catFISH", se basa en la identificación de neuronas que expresan genes inducidos por la actividad, y que se traslocan rápidamente al citoplasma, de tal forma que se pueden identificar, en el orden de minutos, células activadas por al menos dos eventos conductuales diferentes, con una resolución celular incomparable.

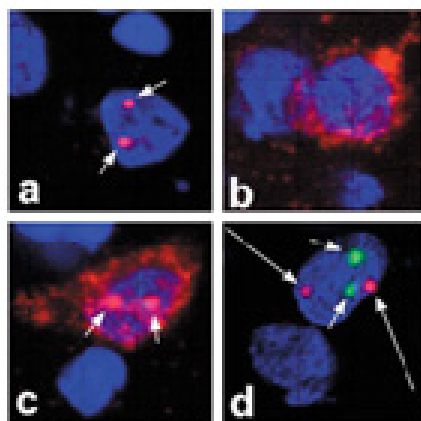


Figura 9. En esta imagen se puede apreciar con la técnica de “CatFISH” marcajes diferentes hechos con hibridación *in situ* fluorescente. Para *Arc* (en Rojo) y *Homer1a* (en Verde) el núcleo de las células esta teñido con DAPI (Azul). La presencia de *Arc* en el núcleo (a) se debe a expresión inducida aproximadamente 5 minutos antes de colectar el tejido, la cual se distingue con dos puntos que son los dos alelos del gen; mientras que la presencia de *Arc* en el citoplasma (b) se debe a actividad que ocurrió 30 minutos antes. La co-localización de *Arc* en el citoplasma (c) u *Homer1a* en el núcleo (d) con *Arc* en el núcleo se debe a que la célula se activo en ambas ocasiones (Modificado de Guzowski, et al., 1999).

El método de “catFISH” utiliza microscopía confocal para la obtención de las imágenes, de tal manera que el análisis se realiza en apilados de imágenes lo que permite una visualización en 3D de los grupos de células de interés. Con el uso de esta técnica, podemos realizar una cuantificación precisa de las células que expresan los genes minimizando errores o problemas estereológicos. Con “catFISH” podemos identificar grupos de células que responden a uno de dos eventos conductuales separados por un periodo de tiempo de ~30 minutos. Hemos utilizado “catFISH” para el estudio de células de lugar en el hipocampo (Figura 9).

En la región de CA1 en el hipocampo aproximadamente 40% de las células que se caracterizan como células complejas o células excitatorias responden o presentan lo que se denomina campo receptivo espacial (“place field”), lo que significa que 40% de las células piramidales de CA1 responden a un lugar específico en el espacio durante la tarea exploratoria (Guzowski, et al., 1999). Un dato importante es que la misma proporción de células que presentan actividad electrofisiológica de células de lugar en un ambiente determinado, expresa *Arc* en las mismas condiciones conductuales. Esto es, 40% de las células en CA1, 20% en CA3 y 50% en la corteza parietal expresa *Arc* a consecuencia de la exploración (Vazdarjanova, et al., 2002; Ramírez-Amaya, et al., 2005) igual a la proporción de células que presenta campos receptivos espaciales en las mismas condiciones conductuales en dichas regiones (Barnes et al., 1990; McNaughton et al., 1994; Qin et al., 1997).

Si se somete a un animal dos veces a un mismo ambiente espacial, ese 40% de células en CA1 se activa en lugares específicos en el espacio, responderá de manera semejante en ambas ocasiones. Como mencionamos previamente, a esto se le llama estabilidad de las células de lugar o estabilidad del mapa cognoscitivo (Jefferey y Hayman, 2004; Muller, 1996). Si por el contrario se somete a los animales a dos ambientes distintos, se observarán grupos independientes de células que responde a cada ambiente. Las células que respondieron al primer ambiente responderán de manera diferente, mostrando otro campo receptivo espacial o simplemente no responderán ante el segundo ambiente y aparecerán muchas células que responden sólo al segundo ambiente (ver figuras 10 y 11). Que tal como mencionamos previamente, a esto le denominamos re-mapeo ('re-mapping') o re-estructuración del mapa (Jefferey y Hayman, 2004; Muller, 1996).

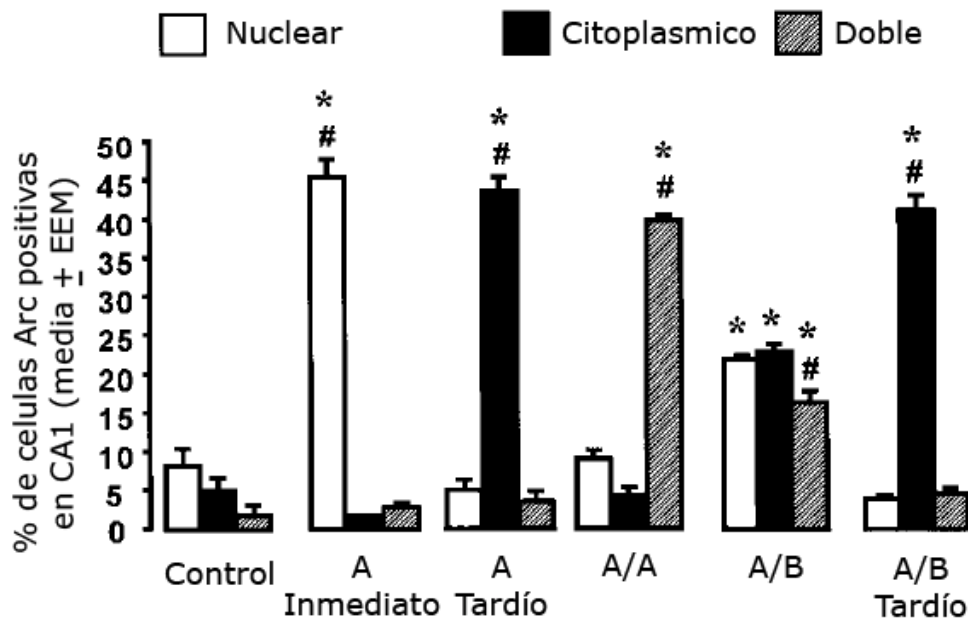


Figura 10. Se muestran los resultados del análisis de la actividad de células de lugar con el uso de “catFISH”, la condición A es un ambiente de exploración cuadrado mientras que la condición B es un ambiente de exploración rectangular localizado en un cuarto diferente. Nótese que después de una sola exploración cuando el animal ha sido sacrificado inmediatamente las células que expresan Arc lo contienen principalmente en el núcleo, mientras que en la condición tardía, que es 30 minutos después de la exploración, Arc se encuentra principalmente en el citoplasma. Solo en las condiciones de doble exploración A/A o A/B el número de células con tinción doble (nuclear y citoplasmática) incrementa. En el caso de A/A la mayoría de las células responde a ambas condiciones de exploración, mientras que en el caso de A/B la proporción de células doblemente marcadas es significativamente menor (#). * $P < 0.01$ con respecto al control (Modificada de Guzowski, et al., 1999).

El método de "catFISH" nos permite identificar grupos de células que se activan ante uno u otro evento de exploración, o bien ante ambos. Esto permite evaluar la estabilidad de la red neuronal cuando se trata de dos eventos semejantes, en donde se espera que el mismo conjunto de células se activen. De la misma manera se puede medir el grado con el que un conjunto de células es capaz de discriminar dos eventos diferentes (Guzowski, et al., 1999; Vazdarjanova, et al., 2002; Vazdarjanova y Guzowski; 2004), o el grado de re-mapeo (Figura 11). Esto permite determinar que grupos de células son capaces de distinguir diferencias, ya sean estas sutiles o salientes, entre dos eventos conductuales.

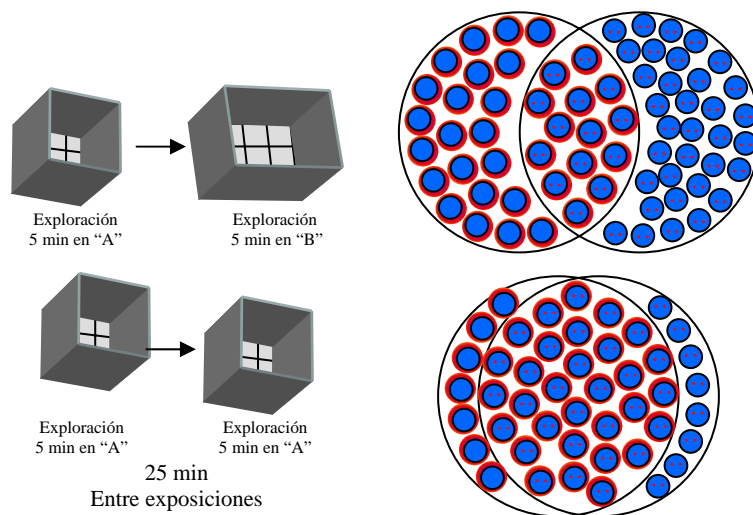


Figura 11. En el extremo derecho se observan los grupos de células, y en el izquierdo los ambientes de exploración. En la parte derecha superior, se representan conjuntos de células que responden de manera independiente a los dos diferentes eventos de exploración a los que se sometieron (extremo superior izquierdo), se observa un re-mapeo; en la parte derecha inferior, conjunto de células que responde de manera estable a los dos eventos semejantes que exploraron (estabilidad). Las células con marca dentro del núcleo representan las células que responden al segundo evento conductual, mientras que las células con marca en el citoplasma, son células que respondieron al primer evento conductual. Las células con ambas marcas respondieron a los dos eventos.

Si bien "catFISH", mediante la identificación de *Arc*, es un método de imagenología muy útil para identificar grupos de células activadas por diferentes eventos conductuales, la detección de *Arc* nos permite identificar a los grupos de células plásticas, ya que como mencionamos previamente, *Arc* es un gen muy relevante para la plasticidad sináptica. Estudios hechos en células de lugar con el uso de "catFISH", han develado aspectos muy interesantes de la expresión de *Arc* que han determinado la dirección del presente trabajo de tesis.

Uno de los hallazgos importantes fue encontrar que en el giro dentado hay una proporción muy pequeña (2%) de células que expresan el ARNm y la proteína de Arc, además de que se mantiene esta expresión al menos por ocho horas (Figura 12) (Ramírez-Amaya, et al, 2005). Los resultados anteriores se obtuvieron con un modelo experimental en el que se trabajó con ratas que fueron sometidas a un programa particular de exploración, en el que la rata era colocada en una caja, la cual exploraba durante cinco minutos, para ello, se le situaba en diferentes cuadrantes de manera aleatoria, para garantizar que durante ese tiempo explorara todo el ambiente. Posteriormente se les colocaba en su caja habitación por un intervalo de tiempo determinado, el cual era diferente entre los diferentes grupos (0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8 y 24 horas), después de este tiempo los animales eran sometidos nuevamente a la condición de exploración en el mismo ambiente y al final de la segunda exploración se sacrificaron inmediatamente. Los cerebros de los animales fueron seccionados (hipocampo izquierdo) y posteriormente sometidos a un tratamiento de inmunohistoquímica y de hibridación *in situ* para detectar la presencia de la proteína de Arc y su ARNm en la misma célula. Se utilizó microscopía confocal para capturar las imágenes (se analizaron las regiones del CA1, CA3 y giro dentado) que posteriormente se analizaron, y con un tratamiento estadístico se logró obtener una caracterización de la expresión de Arc y también la relación de su expresión con el procedimiento de exploración espacial al que se sometió a los animales. Los datos más interesantes que arrojó este trabajo se pueden resumir de la siguiente manera: después de una conducta exploratoria las células piramidales del CA1, CA3 y la corteza parietal expresaron la proteína Arc desde los 30 minutos después de la exploración y 3 horas después la proporción de células con Arc ya estaba a niveles basales; en el punto temporal de 1 hora, las células que expresaron la proteína Arc igualó a la proporción de células que expresaron el ARNm, este último en respuesta a la segunda exploración. Sorprendentemente, a las 8 y 24 horas, un subgrupo de las neuronas piramidales del CA1, CA3 y la corteza parietal, de las originalmente activadas por la conducta exploratoria presentó una reactivación de la expresión de la proteína de Arc.

Sin embargo, en el giro dentado, la historia fue completamente diferente. Las células granulares responden a la exploración en una proporción de ~2%, lo que representa un orden de magnitud por debajo de la proporción observada en las regiones de células piramidales en donde de un 20% a un 40% de las células expresa Arc en respuesta a la misma conducta. Además, la expresión de Arc en el

citoplasma se observa desde los 30 minutos pero se mantiene estable al menos ocho horas (Figura 12).

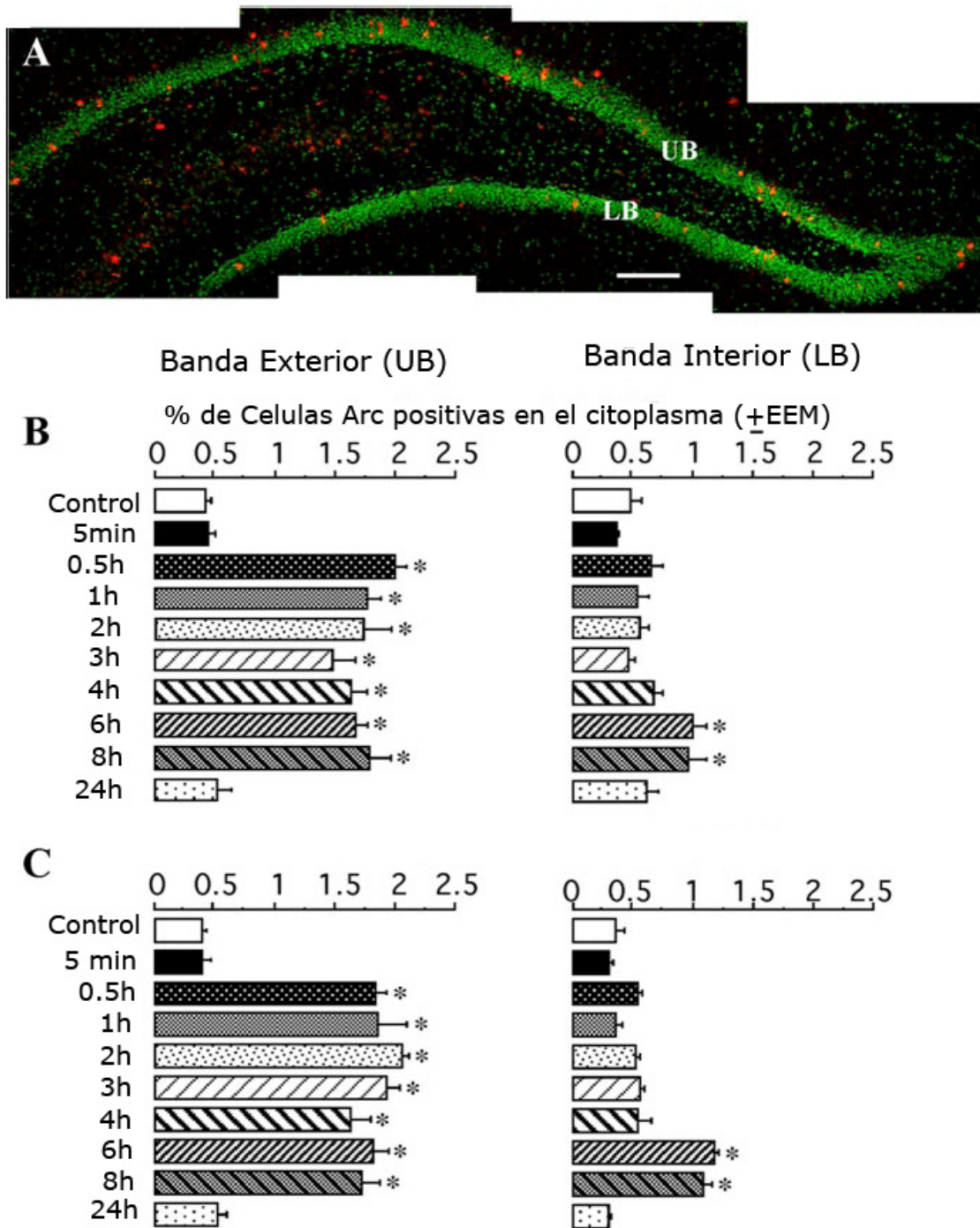


Figura 11. En A se muestra un ejemplo de reconstrucción completa del giro dentado con los núcleos marcados en verde con SYTOX y en rojo se muestran las células que expresan la proteína de Arc. En B se muestra la proporción, del total de células granulares, que expresan la proteína de Arc en el giro dentado después de la exploración espacial. En C se muestra la proporción, del total de células granulares, que expresan el RNAm de Arc en el citoplasma. Nótese que la expresión se mantiene por encima de los niveles basales (control) por un periodo de al menos 8 horas (Modificada de Ramírez-Amaya; 2005).

Los descubrimientos de trabajo de Ramírez-Amaya et al. (2005), sugieren que se necesitan una reactivación con dos o más olas de expresión de la proteína de *Arc* o bien una presencia sostenida de este gen para estabilizar los cambios plásticos asociados a este gen, como pueden ser la endocitosis de receptores AMPA que induce escalamiento sináptico (Shephard, et al., 2006) u otros tipos de plasticidad asociada a la interacción de *Arc* con otras moléculas como CAMKII y BDNF (Bramham y Messaoudi; 2005) que pondrían conducir a modificaciones en la estructura de la sinapsis. De ser así, de *Arc* podría representar la firma anatómica de la actividad sináptica que subyace a la consolidación de memorias.

El que el giro dentado (GD) responda de manera tan notablemente diferente es de particular importancia, dadas las características funcionales de esta región hipocampal. La circunvolución dentada, que recibe este nombre por sus proyecciones en forma de diente, (del latín *dens*, "diente"), es importante por sus singulares cualidades plásticas, la particularidad de sus neuronas, la correlación entre sus fenómenos internos, con memoria (específicamente la espacial) y el fenómeno de neurogénesis. Esta estructura, se ha descrito como una estructura de tres láminas, un estrato molecular, estrato de células granulares y otro polimórfico. El estrato molecular se encuentra en continuidad con el estrato molecular del hipocampo; el segundo estrato está formado de células piramidales pequeñas (células granulosas), que se organizan densamente, sus proyecciones axónicas constituyen el sistema de fibras musgosas que une el GD y el hipocampo; por último, el estrato polimórfico se forma por células variadas: piramidales e interneuronas (como las células de canasta), las eferencias de GD no salen de la formación hipocámpica. (Afifi y Bergman, 1999). El GD, recibe entradas de regiones subcorticales, lo que incluye regiones como el núcleo septal, los núcleos supramamilares, el locus coeruleos y los núcleos del rafe (Amaral y Witter, 1989).

Estudios comparativos del GD y CA3, revelan que éste, junto con la región del CA3 del hipocampo realizarían una separación de patrones espaciales, lo que da lugar a procesos como la discriminación y el reconocimiento de lo familiar. (Gill, et al., 2007).

Otros datos muestran que en una exploración espacial, muy pocas de las células granulares (aprox. 2%) del giro dentado responden como células de lugar

(Gothard et al., 2001); mientras que en las regiones del CA1 y CA3 la proporción de células piramidales activadas es aproximadamente de 40% y 20% respectivamente (Leutgeb, et al., 2004). Lo anterior coincide con los datos que se obtienen con "catFISH", pues revela que existe una diferencia en los patrones de actividad en estas subregiones del sistema hipocampal, lo que sugiere un papel distintivo para cada región en la codificación de memorias.

De esta forma tenemos que si menos células responden activándose, el traslape entre los ensambles neuronales en CA1 es mayor que en CA3 y, el giro dentado con su escasa tasa de respuesta, resultaría con la menor cantidad de traslape en los ensambles. De esta manera el GD es una estructura, que por sus características de respuesta, cumple mejor con el principio de escasez de la respuesta, y que por ello, puede tener una alta capacidad de almacenamiento (Chawla et al., 2005).

Estos resultados apoyan la idea de que el GD tiene un papel relevante en la ortogonalización de la información espacial, en donde su función recae en la separación de patrones espaciales de una forma más eficaz y susceptible a cambios sutiles en el entorno (Sakurai, 1999; McNaughton, 1996). Lo anterior puede verse como que sin la función del giro dentado no se podrían reconocer condiciones de contextos espaciales como novedosos o familiares.

También se ha observado que después de una destrucción masiva de las células granulares del GD utilizando la neurotoxina colchicina, las células de lugar de las regiones del CA1 y CA3 presentan un ligero cambio, sin embargo, su funcionamiento no se ve afectado, lo que resulta contrastante dado que las células granulares del giro dentado fueron destruidas en un 75% (McNaughton, et al., 1989). Lo anterior sugiere que el papel del giro dentado no radica en transmitir información espacial a estas regiones y que proyecciones directas de las capas II y III de la corteza entorrinal hacia CA3 y CA1, respectivamente son las que envían la información sensorial necesaria para la respuesta de las células de lugar (McNaughton, et al., 1989). Pero la destrucción o el daño de las células granulares afecta notablemente la consolidación de la memoria espacial, lo que resulta en que cada ambiente sea novedoso, es decir no hay un reconocimiento del espacio. Si consideramos estos datos junto con la evidencia de que el porcentaje de células granulares que responde a la conducta de exploración es muy bajo, generando una representación escasa y por lo tanto altamente eficiente desde el punto de

vista mnémico, la función del GD en la consolidación de memorias espaciales es particularmente importante.

Por lo anterior la presencia del ARNm de *Arc* y su proteína por encima de niveles basales por un periodo tan largo como 8 horas (Ramírez-Amaya, et al, 2005) sugiere que *Arc* debe de estar cumpliendo con un papel importante y distintivo en cuanto a la formación de memorias espaciales, dado que en muchos aspectos encontramos singularidades en el operar de esta estructura, como ya describimos. La pregunta que surge entonces es cuales son los mecanismos que subyacen esta presencia sostenida de *Arc* en las células granulares.

Existen dos posibilidades del porqué *Arc* se mantiene por un periodo tan largo en las células granulares después de la exploración: a) El ARNm de *Arc* tiene una vida larga en el GD a diferencia de las otras estructuras en donde se degrada rápidamente; o, b) El ARNm de *Arc* se transcribe de manera continua o sostenida por 8 horas.

Entender el mecanismo mediante el cual el sistema garantiza la presencia de *Arc* en las células del giro dentado es importante para entender otros eventos celulares que subyacen la consolidación de la memoria ya que se ha sugerido que la presencia sostenida de *Arc* debe ser relevante para completar los cambios plásticos en las sinapsis de las células que formaran parte de los ensambles de memoria a largo plazo (Bramham y Messaoudi, 2005).

El diseño experimental se planteó con el propósito de caracterizar lo siguiente: la presencia sostenida de *Arc* en el giro dentado, esto es si se trata de un solo evento transcripcional o de muchos a través del tiempo, y el curso temporal de esta presencia sostenida de *Arc*. Partimos de la idea de que si detectamos el intron de ARNm de *Arc*, con hibridación *in situ* fluorescente, podremos garantizar que la presencia de *Arc* en el núcleo (como dos focos de expresión que representan los dos alelos del gen), se deba a una transcripción reciente, mientras que la presencia de *Arc* en el citoplasma de la célula que sabemos que ocurre después de 30 minutos (Vazdarjanova, et al., 2002) representará a las células que se activaron con anterioridad. Si identificamos entonces las células que expresan tanto el intron (en el núcleo como transcripción reciente) como la sonda completa de *Arc* (en el citoplasma como la transcripción temprana) después de que los animales han explorado en una sola ocasión y son sacrificados a diferentes tiempos, podremos

determinar si las células granulares siguen, o no, iniciando la transcripción de *Arc* a lo largo del tiempo y cuánto tiempo dura este evento.

Planteamiento del Problema

En el GD, como consecuencia de una exploración espacial, el gen de expresión inmediata *Arc*, se expresa y se mantiene durante un periodo de al menos 8 horas, en un grupo significativamente numeroso de células granulares; en comparación con los animales controles, que no exploraron. Como mencionamos anteriormente, existen dos posibles explicaciones de cómo *Arc* podría mantenerse por tal periodo de tiempo. Una posibilidad es que su ARNm no se degrade y la otra, es que la célula granular presente una transcripción sostenida del gen. En este trabajo se tiene el propósito de discernir cuál de estos mecanismos hace posible la presencia sostenida de *Arc* y caracterizar temporalmente dicho fenómeno. Por lo anterior hemos definido los siguientes objetivos.

Objetivo general: Estudiar uno de los eventos celulares, que pueden estar asociados a los mecanismos de plasticidad sináptica que subyacen la consolidación de la memoria, que ocurre en las células granulares del GD del hipocampo de la rata adulta a consecuencia de la conducta de exploración espacial.

Objetivo particular: (1) ¿La presencia sostenida de *Arc* en las células granulares del GD del hipocampo de la rata adulta después de la exploración de un ambiente novedoso, se debe a la transcripción sostenida de este gen? (2) ¿cual es el curso temporal de esta presencia sostenida de *Arc* en las células granulares del GD del hipocampo de la rata adulta después de la exploración?.

Meta: Desarrollar una estrategia metodológica que nos permita identificar por separado el transcrito reciente de *Arc* del transcrito tardío, después de un sólo ensayo de 5 minutos de exploración. Identificar con claridad las células que presentan transcripción reciente de *Arc* y distinguirlas de aquellas que presentan transcripción tardía del gen, utilizando la detección del intron y la sonda completa de este gen para cada caso, respectivamente. Mediante el sacrificio de los animales a diferentes tiempos, después de sólo un ensayo de exploración espacial, caracterizaremos el curso temporal de la presencia sostenida de *Arc* y determinaremos la duración de la posible transcripción sostenida de este gen, por

medio de la identificación y clasificación de las células granulares que presenten su transcrito reciente, su transcrito tardío o ambos.

Hipótesis: La exploración de un ambiente novedoso por ratas adultas, induce la expresión de *Arc* en las células granulares del GD, que se mantendrá sostenidamente debido a la transcripción constante de este gen, lo cual se evidenciará por la presencia de transcrito reciente en animales sacrificados varias horas después de la exploración. La transcripción sostenida durará alrededor de 8 horas.

Metodología

Sujetos: Se utilizaron 32 ratas de la cepa Wistar de 8 meses de edad. Las ratas a esta edad se consideran adultos completamente maduros y su crecimiento ya no es un factor que necesite controlarse. Los animales se separaron en cajas de policarbonato individuales y habitaron en un ciclo invertido de luz-oscuridad 12:12. El consumo de agua y comida se mantuvo *ad libitum*.

Conducta: Los animales fueron sometidos a una sola exploración, en una caja cuadrada de 65x65 cm. con paredes de 20 cm de alto; la iluminación del espacio donde se realizó la exploración fue tenue, esto es al 15% de la intensidad de 4 focos de 60W. La luz tenue se utiliza regularmente en este tipo de procedimientos conductuales. La exploración duró 5 minutos. Después de la exploración los animales fueron sacrificados en los siguientes tiempos: 5, 30, 120, 360, 480, 720 y 1440 minutos (cada grupo con una n=4); y 4 animales, considerados como el grupo control (intacto), se sacrificaron sin recibir la experiencia de exploración, en las diferentes horas del día en las que se sacrificaron al resto de los animales siguiendo el protocolo de Ramírez-Amaya y colaboradores en 2005

Protocolos conductuales previos (Chawla, et al., 2005; Ramírez-Amaya, et al., 2005 y 2006; Rosi, et al., 2005) en donde utilizaron dos ensayos de exploración separados por uno o varios intervalos tiempo, en comparación con este trabajo donde sólo se realizó una exploración con diferentes intervalos temporales entre la exploración y el sacrificio.

Obtención y procesamiento de los tejidos cerebrales: Los animales fueron sacrificados por decapitación y sus cerebros se extrajeron rápidamente, se colocaron en un molde de plástico de PVC, el cual se sumergió en una solución de 2-methyl-butano, enfriada a ~ -30°C mediante un baño en alcohol etílico y hielo seco. Los cerebros se almacenaron en un congelador a -70°C; y posteriormente fueron seccionados con el uso de una matriz de sección para tejido de 2.7 x 2.5 de área interior (electrón microscope sciences®). Se seleccionó sólo el hemisferio izquierdo por cada animal (las comparaciones de la expresión ínter-hemisféricas no mostraron resultados estadísticamente significativos), partiendo desde la mitad del fornix hasta el final de la corteza entorrinal, se utilizó como referencia el límite entre la corteza y el cerebelo (el procedimiento con la matriz fue el siguiente: se colocó la primera navaja en el límite de la corteza y el cerebelo; la segunda, 2mm anterior a la primera; y la tercera 8mm, anterior en relación a la segunda) (Figura

13-A), de tal manera que todas las hemisecciones, de cada uno de los animales, presentaron una altura semejante de corte ($\pm 0.5\text{mm}$). Además, para garantizar la mejor equidistancia en la altura antero-posterior posible, se colocaron los cerebros en el molde de plástico con la parte posterior en la base del molde, ya que esta región era la mas equidistante posible. De esta manera, en un molde de plástico se colocó la mitad del cerebro de un animal de cada uno de los grupos (es decir, 8 hemi-secciones en cada molde), y se cubrió con "Tissue tek OCT®" (Figura 13-B) y se congeló rápidamente con hielo seco, para generar un bloque sólido. Como resultado se formaron cuatro bloques que contenían 8 muestras, una de cada grupo experimental.

Con el uso de un criostato Leica 1850 a $\sim -18^\circ\text{C}$ se seccionaron los bloques con los cerebros a $20\ \mu\text{m}$ de grosor (Figura 13-C). Cada sección se monto en una laminilla (Superfrost VWR). De esta manera cada laminilla contenía 8 hemi-secciones del cerebro de cada uno de los animales de los diferentes grupos, lo cual es muy importante, ya que permite reducir la variabilidad de la tinción entre los animales de los diferentes grupos. La variabilidad que se observa en la tinción entre las diferentes laminillas, aun cuando son teñidas todas al mismo tiempo, puede afectar la interpretación de los resultados, por ello cada animal se compara con su propio control (ver procedimiento de imagenología confocal) colocado en el mismo bloque. Los tejidos montados en las laminillas se dejaron secar y se almacenaron en cajas oscuras herméticas (para evitar la entrada de luz y humedad en el tejido) y se congelaron a $-70\ ^\circ\text{C}$ hasta que se efectuó el procedimiento histológico.

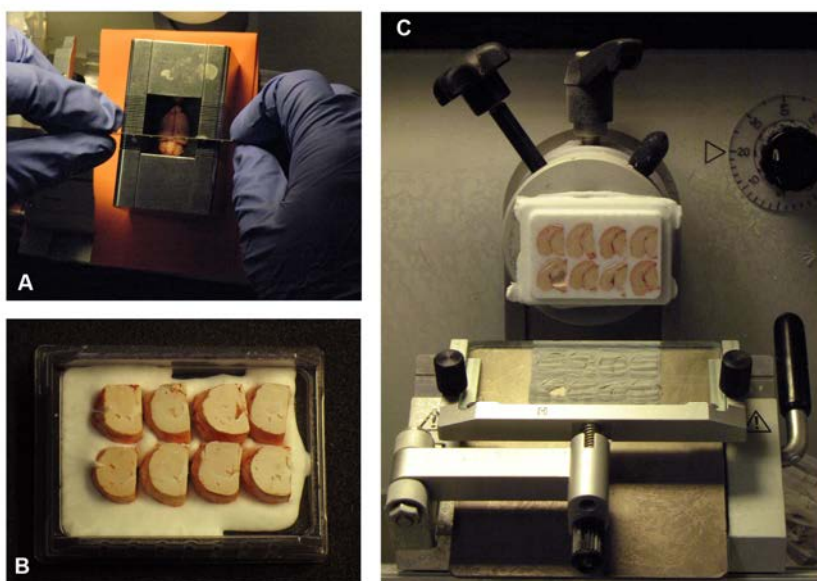


Figura 13. Procedimiento de construcción del bloque; cada bloque contiene un cerebro de cada grupo experimental (8 cerebros). En A se muestra como se corta un cerebro en la matriz de sección; en B se observan los hemicerebros montados en un molde con una base de "Tissue tek OCT®"; en C se muestra un bloque de cerebros montado en el criostato, y también se aprecia un corte listo para montar en la laminilla.

Inmunocitoquímica: Los cerebros fueron procesados en hibridación *in situ* fluorescente para detectar tanto el intrón de *Arc* (trascrito reciente), como el gen completo de *Arc* en el citoplasma (trascrito tardío).

Se realizó la síntesis de la sonda de ARN utilizando un templado de ADN obtenido de un plásmido diseñado en los laboratorios del Dr. Paul Worley y del Dr. John Guzowski. Se utilizaron plásmidos que contienen secuencias de ADN probadas para la fabricación de sondas de ARN que detectan *Arc* completo y *Arc* intron de manera independiente. Los plásmidos son cortados con enzimas de restricción (ECOR1 para la sonda completa de *Arc* y HIND III) para linearizarlos, el templado linearizado se verifica con un gel de agarosa tenido con bromuro de etidio (Figura 14).

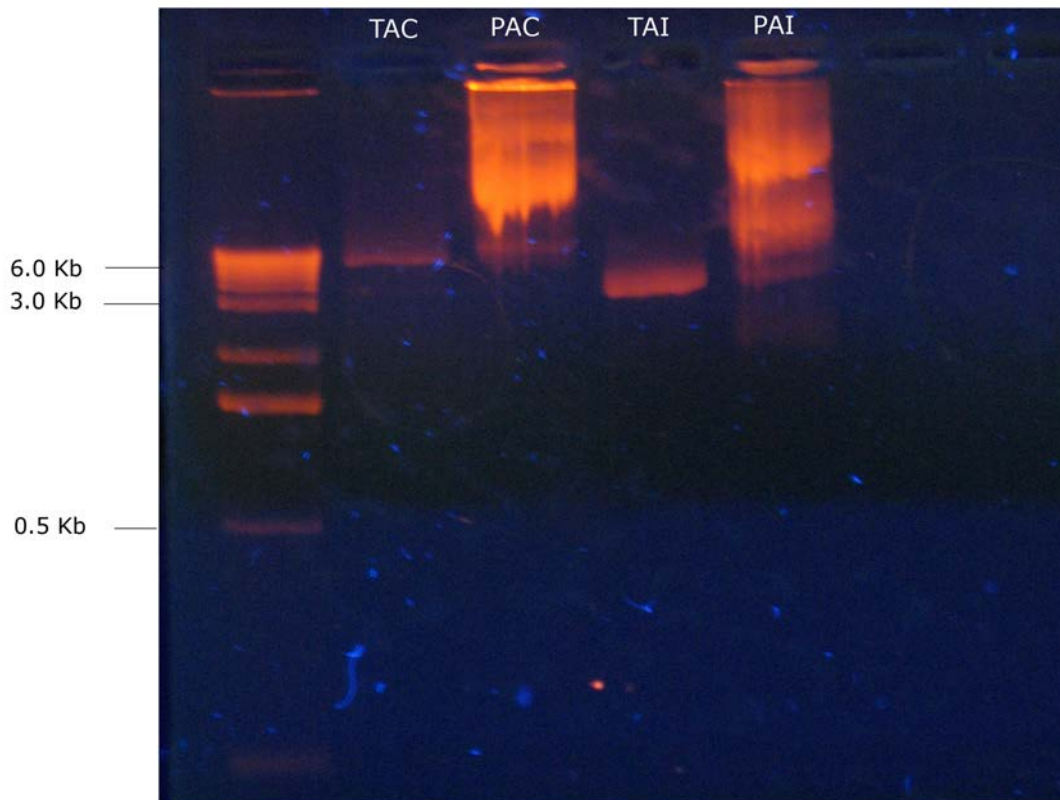


Figura 14. Gel de agarosa en donde en el primer carril se corrió la escalera de ADN y a la izquierda se encuentran los pesos aproximados. En el segundo carril observamos el templado de *Arc* completo (TAC); en el tercer carril se observa el plásmido de *Arc* completo (PAC) ; el templado de *Arc* intron (TAI) y el plásmido de *Arc* intron (PAI).

El templado se utiliza para sintetizar la sonda con el uso de un kit comercial que contiene la polimerasa de ARN (Maxi script T7/T3 Ambion®) y con el uso de

nucleótidos marcados (RNA labeling mix ROCHE ®, el cual contiene 3.5mM de DIG-11-UTP, junto con 10mM de ATP, CTP, GTP y 6.5 mM de UTP) con digoxigenina (para la sonda de *Arc* completa) o fluoresceína (para la sonda de *Arc* intrónica) se realizó la síntesis de las sondas de ARN. Las sondas marcadas se verificaron con un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (Figura 15)

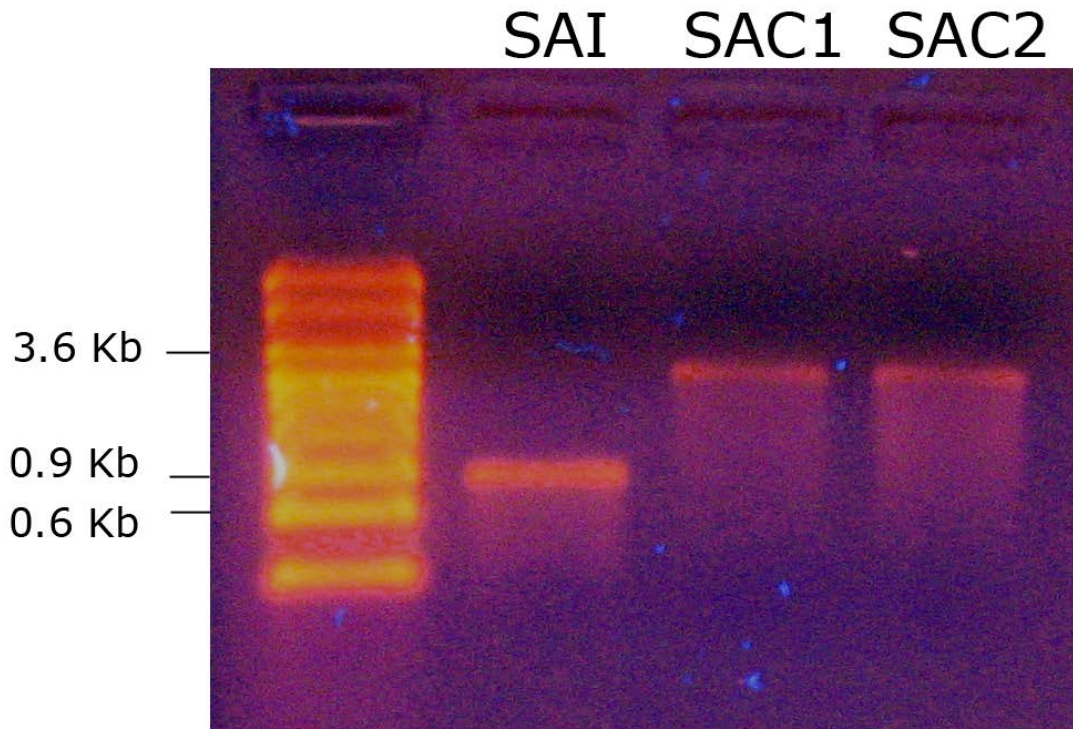


Figura 15. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Primero se presenta la escalera de ARN y a su izquierda se encuentran los pesos aproximados. En el segundo carril observamos la sonda de *Arc* intrónica, marcada con fluoresceína (SAI); en los carriles tercero y cuarto se observa la sonda de *Arc* completo (SAC1 y SAC2) marcadas con digoxigenina.

Se seleccionaron de 4-6 tejidos adyacentes por bloque del hipocampo y se colocaron en rejillas de plástico para el tren de tinción (Tissue Tek slide staining set Sakura ®). Los tejidos fueron fijados en 4% paraformaldehído (pH 7.4), después se colocaron en una solución de acético anhídrido (1.25ml de acético anhídrido SIGMA®, 3.7ml de trietanolamina SIGMA®, 2.3g de NaCl SIGMA® en 250ml de agua DEPC SIGMA®), se lavaron con 2XSSC (dilución 1:10 en agua DEPC de la solución 20xSSC SIGMA®) y después se colocaron en una solución de acetona y metanol (50% de cada uno a -20°C), se lavaron una vez más con 2XSSC y después se incubaron en una solución de buffer de pre-hibridación (SIGMA®), por 30 min. en una cámara hermética de incubación con papel "bloth" humedecido con 50% de Formamida en 1XSSC. Una vez prehibridizados, los tejidos fueron incubados (en la misma cámara) con las sondas diluidas (300ng de

sonda por cada 100ul de buffer de hibridación) en el buffer de hibridación (SIGMA®), se vierte entre 95 y 110ul de esta solución por cada laminilla y encima se coloca un cubre objetos. La cámara de incubación con las laminillas se colocó en un horno de hibridación a 56°C por un periodo de 16-18 horas. Después de esto, las muestras se lavaron en 3 ocasiones con 2XSSC y RNAsa A en 1XSSC para deshacerse del resto de la sonda no hibridizada y una vez lavado el tejido, se procedió a incubarlo con un anticuerpo peroxidado (Roche®) dirigido contra digoxigenina (para la sonda completa de Arc), por 24 horas. Después se realizó la detección con un sistema TSA® de amplificación fluorescente Cy3 (para el intron). La detección del segundo ARNm (la sonda completa) se hizo incubando este mismo tejido con un anticuerpo dirigido a fluoresceína y revelado con el mismo sistema de fluorescencia usando un fluorocromo diferente como FITC. Los núcleos de las células se tiñeron con el marcador de DNA TO-PRO-3 (Molecular Probes®). Los tejidos fueron cubiertos con Vectashield® para proteger la fluorescencia y se colocó un cubreobjetos, se fijaron exteriormente con barniz de uñas transparente.

Microscopía confocal: Se utilizó un microscopio confocal Zeiss® LSM meta 510 para capturar las imágenes confocales, mediante el uso del objetivo 40x, con 1 unidad Airy para calcular la apertura del diafragma confocal o "pinhole" en todos los casos. Todas las imágenes se toman con el panorama más amplio del objetivo 40x, utilizando el plano Z desde lo más profundo de la tinción visible hasta lo más superficial. De esta manera se obtienen apilados de imágenes que en promedio tienen un grosor de ~18um y consisten de un total aproximado de 50 imágenes a lo largo de los diferentes planos de la muestra, cada una con aproximadamente 430nm de grosor y una zona de traslape del 25%. Para la captura de los apilados de imágenes se utilizan 3 láseres con los que se excitan de manera independiente cada uno de los fluoróforos, utilizando el sistema multitrack. Para detectar el intron de Arc, el cual se visualiza en rojo, se excita Cy3 con el DPSS de 561nm y se utiliza un filtro dicróico de 575-615nm; para detectar la sonda completa de Arc, la cual se visualiza en verde, se excita FITC con el argón de 488nm, utilizando un filtro dicróico paso alto de 505nm; finalmente para detectar la tinción nuclear, la cual se visualiza en azul, se excita TO-PRO-3 con el HeNe de 633nm utilizando un filtro dicróico de 640-693nm. La definición de los parámetros de captura de los apilados, esto es, el poder del láser, la ganancia y el contraste confocal u "offset", se establecieron en el tejido de los animales controles, que como se explicó previamente, cada laminilla cuenta con un tejido de cada uno de los diferentes grupos, incluyendo un control. Debido a la escasez de la respuesta a la exploración en las células del giro dentado (Chawla, et al., 2005; Ramirez-Amaya, et al.,

2005), se capturan apilados de imágenes a lo largo de toda la banda superior del GD de cada uno de los 8 tejidos en la laminilla. Se comienza a capturar apilados de imágenes desde la unión de las dos bandas o "genu" hasta llegar al extremo de la banda superior. Se utilizó la imagen más cercana al plano medio de la muestra y se realizó la reconstrucción en 2D de la banda superior del GD (Figura 16), en la cual se conjuntan todas las tomas hechas a lo largo del giro dentado.

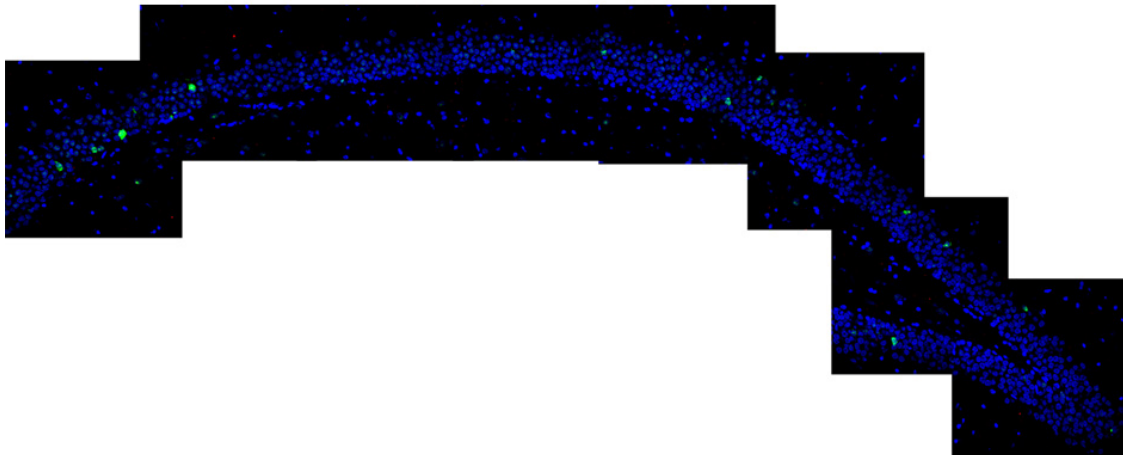


Figura 16. Reconstrucción de la banda superior de un giro dentado. La imagen se obtuvo mediante el empalme de 8 tomas con microscopía confocal, cada toma está ubicada en el plano medio del eje Z. Se observan las células activadas en color verde y su disposición no constituyó ningún patrón en específico.

Análisis de las imágenes: para realizar la clasificación de las células se utilizaron los apilados de imágenes confocales en donde con el uso de reglas de inclusión basadas en la determinación de los planos medios de la imagen, se identificaron las unidades neuronales que tienden a estar completas en todo el grosor (~18um) del tejido, estas reglas también permiten evitar el sesgo en la inclusión de unidades por su tamaño, mediante la inclusión de todas las unidades que se encuentren en los planos medios y se excluyen las unidades gliales las cuales se identifican por sus características de tamaño y su tinción lisa en la superficie. La clasificación de las células se hizo de la siguiente manera: *Arc* nuclear positiva, aquellas solamente con tinción del intron de *Arc* en el núcleo; *Arc* citoplásmico positivo, como aquella con tinción de la sonda completa de *Arc* en el citoplasma o alrededor del núcleo exclusivamente; *Arc* doble, como aquellas en las que coinciden las dos clasificaciones definidas previamente.

Si bien la clasificación se realizó con los apilados de imágenes, el conteo final para cada GD completo se realizó utilizando la imagen de la reconstrucción, y se

descartó a las células que aparecieron en el área de traslape con la imagen consecutiva en la reconstrucción.

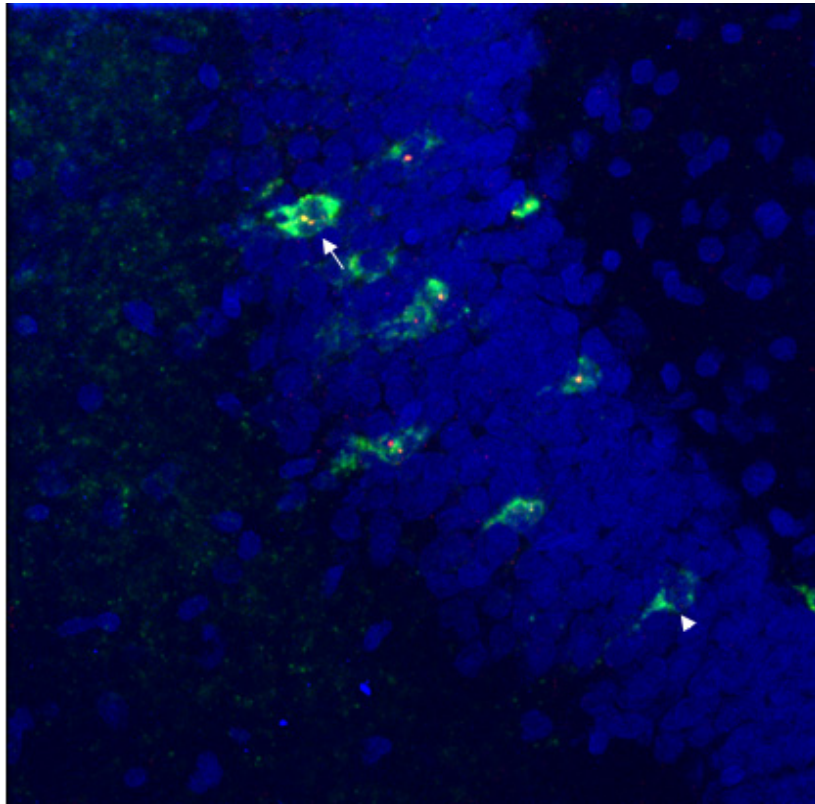


Figura 17. Células granulares en el GD expresando *Arc*, los apilados de imágenes permiten observar estas células mediante un “barrido” a través de los diferentes planos en el eje Z, por lo que si en el primer plano sólo se observa un marcaje en citoplasma al pasar a los siguientes planos es posible detectar si la expresión de *Arc* pudiera observarse o no también en el núcleo. El núcleo de las células se aprecia en color azul, marcado con TO-PRO-3; la detección de la sonda completa de *Arc*, tanto en el citoplasma como en el núcleo, se observa de color verde, y la sonda del intron de *Arc* se observa como dos puntos rojos en el núcleo, éstos se observan regularmente en color amarillo debido a la co-localización del intron de *Arc* y de la sonda completa. La mayoría de las células que expresan *Arc* lo presentan tanto en el citoplasma como en el núcleo (como la célula que muestra la flecha), estas células se clasifican como *Arc* doble. Pocas células muestran sólo tinción citoplásmica (ver cabeza de flecha) y son clasificadas como *Arc* citoplásmico. Esta imagen fue tomada de una animal que exploró una sola vez por 5 minutos y se sacrificó 30 minutos después.

De esta manera, las reconstrucciones se usaron como referencia para la cuantificación del número de células en las diferentes clasificaciones y permitieron estimar el número total de células granulares por unidad de volumen, utilizando los datos obtenidos por conteos exhaustivos previos (hechos en 200 imágenes confocales de células granulares del GD de animales adultos maduros) que permiten hacer dicha estimación (Rosi, et al., 2005; Ramírez-Amaya, et al., 2005). El procedimiento consiste en medir el área de la banda de células granulares en la reconstrucción y calcular el volumen, utilizando el dato de grosor obtenido en los apilados de imágenes confocales. Se utiliza así, la siguiente fórmula para la estimación del número de células:

$$100 * \frac{p}{A_p * (N/A)}$$

Donde P es el número de neuronas $Arc+$; A_p es el área en μm^2 de la banda de células granulares del giro dentado medida en la imagen reconstruida; N es el número total de células que se obtienen en imágenes de 40x tomadas a lo largo de los planos Z (tomado de los conteos previos); y A es el área total en μm^2 de cada una de las imágenes tomadas de los planos medios de los apilados de imágenes confocales del GD.

Para el análisis que se presenta en este trabajo únicamente se consideró la banda superior ya que esta es la única que responde de manera inmediata a la exploración espacial expresando Arc (Chawla, et al., 2005; Ramírez-Amaya, et al., 2005). Todo el análisis que describió previamente se realizó mediante el uso del sistema Metamorph® y las reconstrucciones se hicieron con el uso de Adobe Photoshop®.

Cuantificación y análisis estadístico: Se obtuvo el estimado de células granulares incluidas en el estudio de cada animal y también el número de células con Arc en el citoplasma (completo), Arc en el núcleo (intrón) y doble marcadas (citoplasmático y nuclear). Del total de células granulares y de las células clasificadas para cada condición (sumando todas las imágenes analizadas por animal) se calcula la proporción de células para cada clasificación por animal. A estos datos se les aplicó una "ANOVA" de una vía y también el posthoc con Bonferroni corrigiendo para comparaciones múltiples. Nótese que la N de cada grupo es de 4, en los estudios en los que se usa el análisis "catFISH", la variabilidad se reduce con la inclusión de un mayor número de unidades celulares, más que con el incremento en la N de animales. En este estudio se incluyeron en promedio 30,000 células granulares por animal para el análisis.

Resultados

En el procesamiento de los cerebros se obtuvieron tinciones óptimas en al menos 3 laminillas de cada uno de los bloques. Con el uso de un microscopio confocal Zeiss LSM 510® se obtuvieron imágenes completas con el objetivo 40x (1.3 AN) de todo el giro dentado de 2 a 3 giros dentados completos por animal.

Las imágenes mostraron que los tratamientos de los tejidos con hibridación *in situ* fluorescente permitieron identificar de manera adecuada tanto la sonda complementaria al intrón de *Arc* para ver transcrito reciente, como la sonda complementaria del gen completo de *Arc* para ver el transcrito tardío; al analizar las muestras de tejidos con microscopía confocal se pudieron distinguir los dos marcajes por separado: el *Arc* intrónico nuclear con el marcador Cy3 (en rojo) y la sonda completa para *Arc* en el citoplasma con FITC (en verde), como también el núcleo de las células con TOPRO (en azul). Por lo que la co-localización de *Arc* intrónico y completo se coloreaba en amarillo (verde y rojo juntos), regularmente. Esto resolvió el problema para identificar de manera correcta si había o no transcrito reciente de *Arc* en la célula (Figura 18).

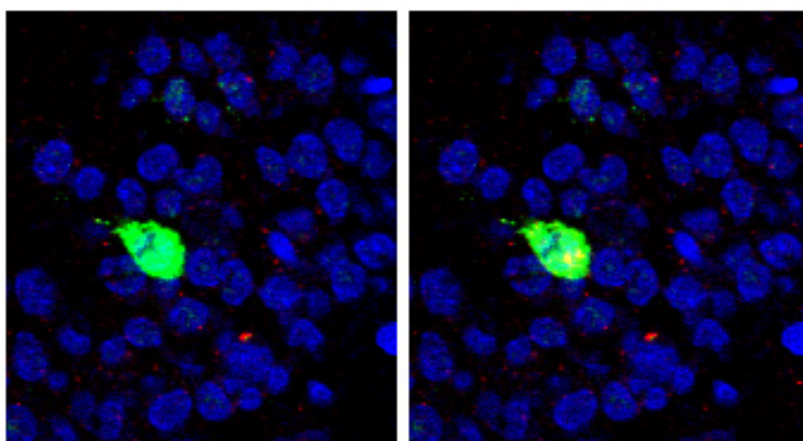


Figura 18. Una misma célula granular de la banda superior del GD. La imagen de la izquierda muestra el marcaje citoplásmico en verde, lo que indica que *Arc* está presente, como se observa, en todo el cuerpo celular, lo que hace indistinguible el transcrito reciente (intrón) de *Arc*. En la figura de la derecha se pueden apreciar dos puntos en color amarillo, que indican una activación del intrón de *Arc* en la célula. Estos resultados se hicieron posibles debido a los dos marcadores utilizados para caracterizar la expresión de *Arc*.

Como ya se había reportado previamente, los resultados obtenidos muestran que aproximadamente el 2% de las células granulares respondieron a la conducta expresando *Arc*, como consecuencia de la exploración espacial (Figura 19). La respuesta muestra actividad inmediata desde los 5 minutos, pues en los resultados se muestran todas las células que expresan *Arc*, tanto en el núcleo como en el citoplasma, como se muestran en un estudio previo (Chawla, et al., 2005). El ANOVA factorial mostró diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($F_{7,20} = 9.892$ $P < 0.0001$), el análisis *post hoc* utilizando Bonferroni que corrige para comparaciones múltiples mostró diferencias por debajo del criterio de $p < 0.01$ entre los controles y los animales sacrificados a 5, 30, 120, 360 y 480 minutos. Los animales sacrificados a los 720 y 1440 minutos no mostraron diferencias significativas con respecto al grupo control ($P = 0.0705$ y $P = 0.5129$ respectivamente).

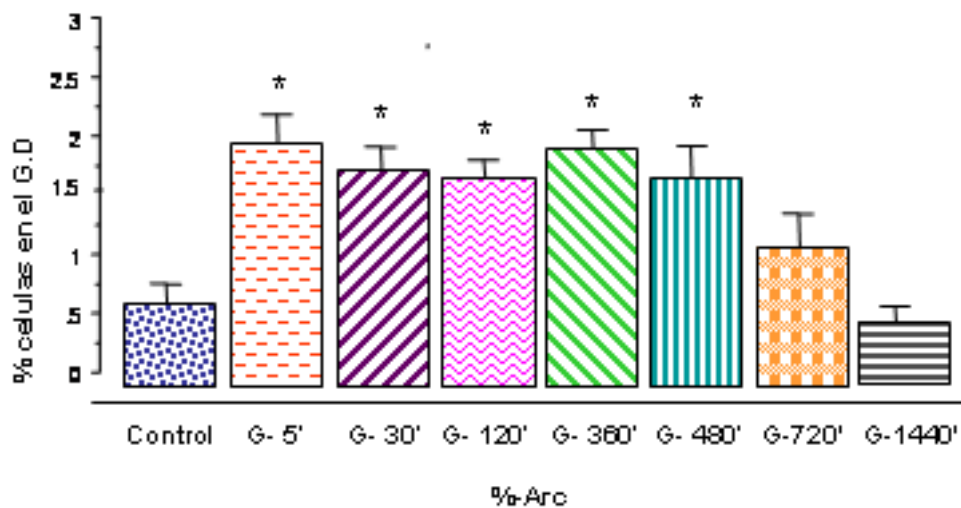
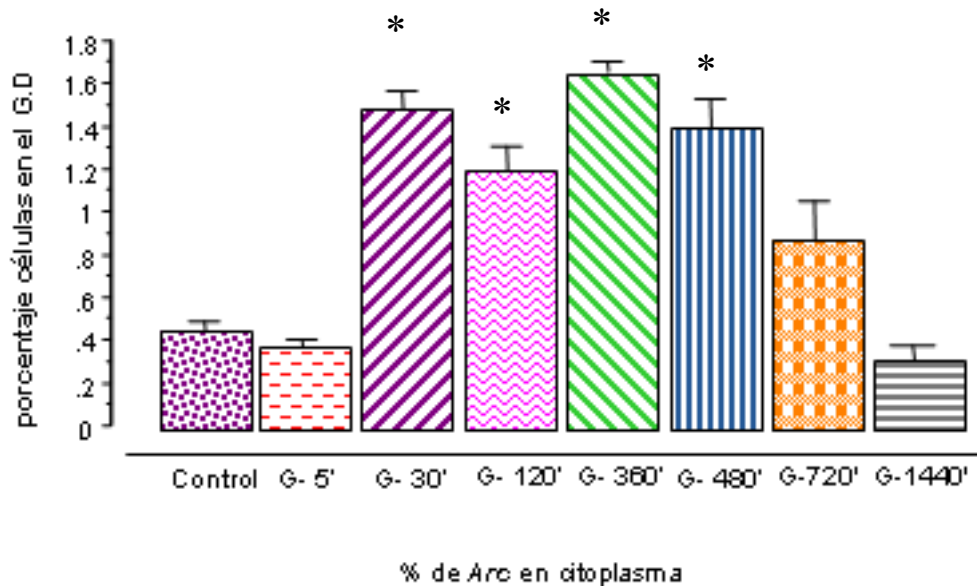


Figura 19. El porcentaje de células que expresaron *Arc* en el GD, a consecuencia de la exploración espacial. Cada barra indica un grupo experimental distinto. El porcentaje de *Arc* en los distintos grupos se mantiene en un promedio que oscila entre el 1.75% y 2%, durante las primeras 8 hrs., posteriormente decae en los grupos experimentales de 720' y 1440' por debajo de los niveles basales (~.5%). En esta grafica se puede apreciar que el número promedio de células granulares que expresan *Arc* se mantiene a través de los diferentes tiempos en cada grupo experimental.

En la figura 20 se muestran los datos de la expresión de *Arc* exclusivamente citoplásmica. En ellos se replican las proporciones obtenidas en los trabajos previos en donde sólo se midió expresión citoplasmática (Rosi, et al., 2005; Ramírez-Amaya, et al., 2005) y en este caso los puntos temporales que muestran diferencias con el control empiezan a los 30 minutos (Figura 20). El ANOVA factorial muestra diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($F_{7,20} =$

23. 921 $P < 0.0001$) y el análisis *post hoc* con Bonferroni mostró diferencias por debajo del criterio de $P < 0.01$ entre el grupo control y los grupos 30, 120, 360 y 480 minutos.



Gráfica 20. Proporción de células detectadas con el mRNA de *Arc* completo en el citoplasma de las células granulares del GD, en los diferentes grupos experimentales. El grupo sacrificado a los 5 minutos de haber explorado, muestra un porcentaje menor al basal, por lo que no ha iniciado el transcrito tardío; a los 30 minutos la tasa se dispara mostrando un porcentaje de ~1.45%. en los grupos posteriores se mantiene por arriba del 1%, excepto por los dos últimos grupos (G-720 y G-1440 minutos).

Es importante señalar dos cosas importantes: primero, en los trabajos previos siempre se utilizaron 2 eventos de exploración (Chawla, et al., 2005; Rosi, et al., 2005) separados por uno o varios intervalos temporales (Ramírez- Amaya, et al., 2005). Los datos que se obtuvieron en los como resultado de la exploración, confirman la idea de que la expresión de *Arc* durante al menos 8 horas se debe a una sola experiencia de exploración además de el hecho de que este nuevo curso temporal muestra que la expresión de *Arc* empieza a decaer alrededor de las 12 horas, ya que los animales sacrificados en ese tiempo no muestran una proporción de células significativamente diferente con respecto al grupo control; segundo, el tratamiento estadístico de los datos, es que si bien los grupos muestran diferencias significativas en comparación con el grupo control, también lo muestran con el grupo experimental sacrificado a los 1440 minutos (Figura 19), lo que muestra que una vez iniciada la expresión del gen, su presencia se mantiene

más o menos estable durante las primeras 8 horas y decae a niveles basales a las 24 horas; lo anterior se sustenta con los resultados de los últimos grupos que corresponden a las 12 y 24 horas, los cuales ya no muestran resultados significativos en la expresión de *Arc*, en comparación con el grupo control (Figura 19).

El análisis de la cuantificación de las células con *Arc* en los diferentes compartimentos celulares, esto es si su localización es en el núcleo, en el citoplasma o en ambos, muestra lo siguiente: el ARNm intrónico característico del transcrito reciente y presente sólo en el núcleo (Figura 21-A) se observa principalmente en el grupo de animales sacrificados a los 5 minutos. El ANOVA factorial para la expresión exclusivamente nuclear de *Arc* (Figura 21-A) muestra diferencias estadísticamente significativa entre los tratamientos ($F_{7, 20} = 9.536$ $P < 0.0001$) el análisis *post hoc* con Bonferroni muestra diferencias estadísticamente significativas en comparación al control por debajo del criterio de $P < 0.01$ solamente en el grupo de animales sacrificados a los 5 minutos. El resto de los grupos no es diferente con respecto al control, pero si lo es con respecto al grupo 5 minutos ($P < 0.01$). En el caso de la tinción exclusivamente citoplásmica característica del transcrito tardío (Figura 21-B), el ANOVA factorial nos arroja diferencias significativas entre los diferentes tratamientos ($F_{7, 20} = 7.656$ $P < 0.0002$), el análisis *post hoc* con Bonferroni muestra que los grupos que son diferentes con respecto al control son los de los animales sacrificados a los 30, 360 y 480 minutos. Cabe señalar que los grupos de animales sacrificados a los 120 y 720 minutos muestran una $P = 0.0729$ y $P = 0.0245$, que si bien esta por encima del criterio de significancia se pueden considerar cercanos a este, lo que indica una expresión citoplásmica marginal.

Finalmente, el análisis de la expresión de *Arc* localizada tanto en el núcleo como en el citoplasma de la célula (Figura 21-C) muestra mediante el ANOVA factorial que existen diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($F_{7, 20} = 12.998$ $P < 0.0001$) y el análisis *post hoc* con Bonferroni mostró que los grupos que alcanzan diferencias estadísticamente significativas por debajo del criterio con respecto al grupo control son los de los animales sacrificados 30, 120, 360 y 480 minutos.

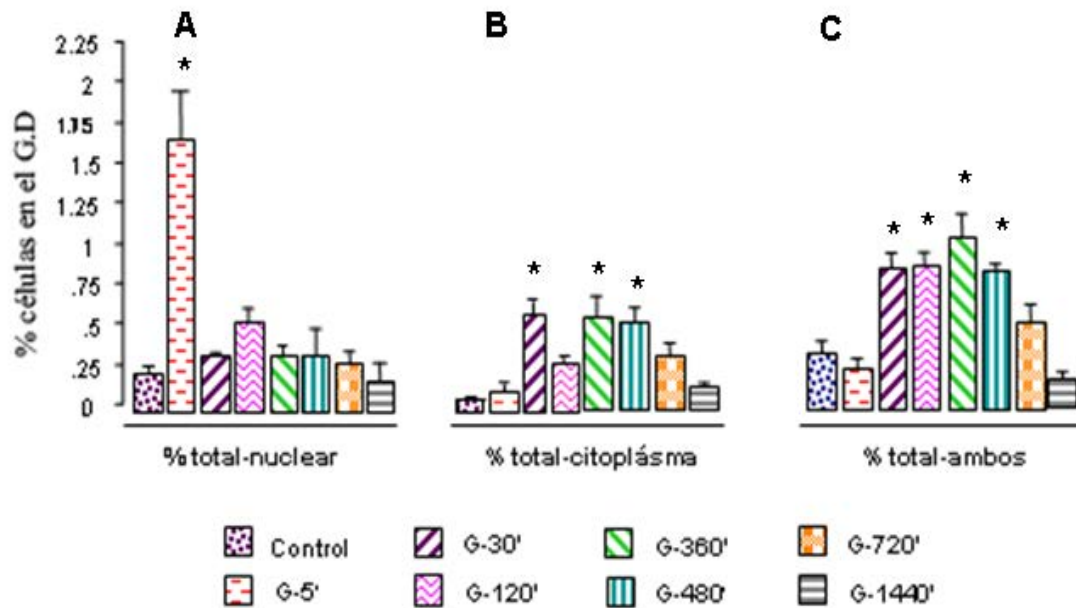


Figura 21. Distribución de células granulares que expresan *Arc*: células con transcrito reciente (A), transcrito tardío (B) y doble transcrito (C), como se observa en las tres gráficas después de las 8hrs., se observa una caída en el número de células expresando *Arc*, en los diferentes grupos experimentales.

En conjunto estos datos muestran que la localización exclusivamente nuclear de *Arc* se observa solamente en el grupo de animales sacrificados 5 minutos después de la exploración, mientras que la localización citoplásmica y doble es significativamente más alta en la mayoría de los grupos sacrificados entre 30 y 480 minutos. Esto sugiere que la mayoría de los grupos, en esos periodos de tiempo, a pesar de haber sido sometidos sólo a un episodio de exploración, presentan expresión de *Arc* tanto en el citoplasma, como en el citoplasma y en el núcleo. Estos datos sugieren que las células que se activaron originalmente por un solo ensayo de exploración son capaces de iniciar nuevamente la transcripción de *Arc*. Ahora bien, la siguiente pregunta que nos hicimos fue, del total de células activadas, cual es la proporción de ellas que muestra tinción del ARNm de *Arc* tanto en el núcleo como en el citoplasma. El análisis de las proporciones de células, del total de células activadas, que muestran *Arc* en los diferentes compartimentos de la célula se muestra en la figura 22. La proporción de células con tinción exclusivamente nuclear o exclusivamente citoplasmática muestra resultados que se asemejan a los del análisis que se muestra en la figura 21 A y B, por lo que obviaremos su descripción. El dato interesante aparece en la proporción de células con tinción tanto citoplásmica como nuclear (Figura 22-C). El ANOVA factorial muestra diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($F_{7,20} = 5.009$ $P < 0.0021$), el post hoc con Bonferroni muestra que solamente el grupo de 5

minutos es diferente del control. En la grafica 22-C se observa que aproximadamente el 50% de las células activadas que muestran tanto tinción citoplasmática como nuclear, en los grupos de 30, 120, 360 y 480 minutos son significativamente más que las observadas en los controles, esto sugiere que la mayoría de las células activadas (el otro 50% que está repartido en nuclear y citoplásmico) muestra al mismo tiempo transcripción tardía y transcripción reciente, a pesar de que los animales fueron sometidos solamente a una sesión de exploración por un intervalo de 5 minutos. Cabe señalar que incluso las células activas en los grupos de animales de 720, 1440 minutos, así como en los controles, se muestra una proporción de células con tinción doble (nuclear y citoplasmática) es cercana al 50% y recordemos que en este caso la proporción de células activas es significativamente más baja que en los animales expuestos a la exploración entre 5 y 480 minutos previo al sacrificio. Lo anterior sugiere que si lo que observamos se trata efectivamente de transcripción sostenida de *Arc*, ésta ocurre de manera frecuente, incluso en condiciones basales de actividad.

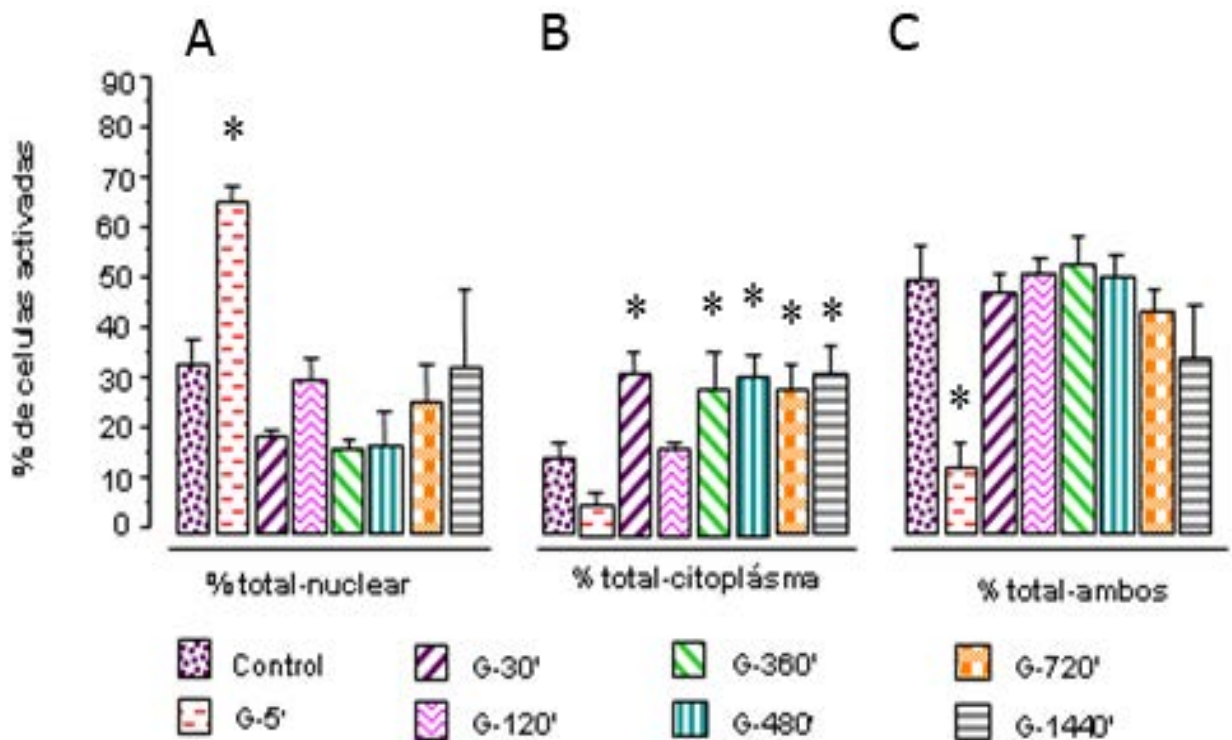


Figura 22. Porcentaje de células expresando *Arc* con transcrito reciente (A), tardío (B) y ambos (C); con relación al total de células granulares que presentan *Arc*. Al menos un 50% de células muestran transcrito sostenido (C), el resto se encuentra distribuido con expresión nuclear y citoplásmica; como se puede observar en A, el grupo con mayor índice es el de 5' que acaba de iniciar su transcrito; en B, se observa una distribución casi homogénea en todos los grupos que expresan *Arc* citoplásmico.

Cabe señalar que las inspecciones visuales del mismo tejido en otras regiones como los cuernos de Ammon en el hipocampo (tanto CA1 como CA3) así como la corteza no presentan numerosas células con tinción doble del ARNm intrónico y el ARNm completo de *Arc*, lo que sugiere que en estas regiones no se presenta el fenómeno de la transcripción sostenida de *Arc*. Así mismo, las tinciones hechas para otros genes de expresión inmediata como Homer 1a, c-Fos y Zif 268 no muestran evidencia de presencia sostenida de estos genes. Sin embargo, si bien las tinciones ya se hicieron, falta el análisis sistemático de los resultados para confirmar dichas observaciones.

En conjunto los datos presentados en este trabajo muestran evidencia histológica de transcripción sostenida de *Arc*, que se incrementa significativamente por arriba de los niveles basales desde los 30 minutos hasta al menos por 8 horas, y a las 12 hora la transcripción deja de ser diferente de los niveles basales.

Discusión

Existen fundamentalmente dos aportaciones importantes de nuestros datos al conocimiento previo: la primera, es el hecho de que al menos el 50% de las células activadas presentan tanto el intron del RNAm de *Arc* en el núcleo, como el resto del gen en el citoplasma, tomando en cuenta que los animales sólo fueron estimulados conductualmente una vez y que el tiempo que dejamos transcurrir fue de más de 8 horas después de la exploración; la segunda, es que esta respuesta perdura establemente por un periodo de 8 horas, y alrededor de las 12 horas se observa un nivel no diferente del basal.

Entonces, podemos decir que *Arc* mantiene su expresión en las células granulares debido a una continua transcripción del RNAm de este gen, y no por una larga vida de éste; lo que se puede ejemplificar al observar la distribución de *Arc* en el grupo experimental de 30 minutos, que se muestra en la figura 22, donde se observa lo siguiente: ~19% de las células presentan exclusivamente *Arc* intrónico, el ~33% *Arc* completo y el ~49% presentan ambos; por lo que podemos notar que existe una población de células granulares, de tamaño importante, que está iniciando la expresión nueva de *Arc* y que también se había activado previamente, que en el caso de los animales sacrificados a los 30 minutos sabemos que esta activación está seguramente relacionada con la exploración que ocurrió previamente como consecuencia de la exploración (ver Chawla, et al., 2005 y Ramirez-Amaya, et al., 2005)

La proporción de células que respondió de manera inicial a la conducta de exploración, esto es a los 5 minutos, es de aproximadamente 2%, y, a pesar de que al analizar las proporciones de células con *Arc* en los diferentes grupos experimentales vemos una cierta fluctuación, la proporción de células activadas se mantiene bastante estable a lo largo de las 8 hrs. Además, lo que también se mantiene estable, es el hecho de que aproximadamente el 50% de las células activadas esta iniciando la transcripción de *Arc* de nuevo, sin que se haya estimulado por una segunda ocasión a los animales.

Podemos interpretar estos datos como indicadores de que *Arc* se transcribe sostenidamente por un periodo de al menos 8hrs. Para garantizar que esta interpretación es correcta, faltaría realizar un experimento farmacológico en el que se inhiba la expresión sostenida de *Arc* con una droga que bloqueé la transcripción, como actinomicina. De esta manera, podríamos concluir que después de una

experiencia de exploración las células granulares siguen iniciando la transcripción de *Arc* sostenidamente. Sin embargo, la evidencia que encontramos aquí sugiere de manera muy plausible, que sea expresión sostenida, dado que al utilizar la detección del intron es muy improbable que la presencia del gen en el núcleo no se deba a un evento de transcripción reciente, ya que entre los mecanismos moleculares de procesamiento del ARNm esta la eliminación y degradación rápida de los intrones (Alberts, et al., 1994).

Pero, ¿qué posibilidad existe de que esta activación sostenida pudiera estar causada por una activación del hipocampo asociada con el ciclo circádico y de que no se tratase de una activación prolongada, exclusivamente relacionada con la experiencia de exploración? En este y otros experimentos se sacrifican a los controles intactos a lo largo de diferentes puntos temporales en el ciclo circádico (Ramírez-Amaya, et al., 2005). En dichos animales, la comparación de la expresión basal de genes tempranos, como *Arc* y *Homer 1a*, en el hipocampo no varía, mostrando en todos los casos una proporción de células granulares que expresan estos genes por debajo del 0.5%. En otros trabajos han reportado que la expresión basal de *Arc* en la corteza podría variar dependiendo de si el animal ha estado despierto o dormido, pero, esto independientemente del horario circádico, en este caso, la variabilidad que se observa en la expresión basal de *Arc* entre el sueño y la vigilia, se observó solo en la corteza y podría estar relacionada con la actividad del animal (Cirelli y Tononi, 2000). Esto contrasta con lo que se observa en otras regiones del sistema nervioso, importantes para la regulación circádica, como el núcleo supraquiasmático; en esta estructura del hipotálamo, las neuronas muestran variaciones en la expresión de *Arc*, asociadas con el ciclo luz–oscuridad (Nishimura, et al., 2003), como ocurre con otros genes que se inducen con este cambio en la estimulación como *c-fos*, *Jun B* y *Zif268* entre otros (Berke et al., 1998). *Arc* se expresa en respuesta a la luz con un curso temporal que muestra su pico entre los 30-60min después del inicio de la fase luminosa; lo anterior hace sentido, pues las neuronas del núcleo supraquiasmático muestran actividad eléctrica en respuesta a la estimulación luminosa (Kreisel, et al., 1978; Rusak y Groos; 1982) y estos genes, como mencionamos previamente, son inducidos por la actividad celular que ocurre en esta región en respuesta al inicio de la fase de luz. Dado todo lo anterior, es altamente improbable que la presencia sostenida de *Arc*, en el giro dentado, después de la exploración esté relacionada con activación circádica en el hipocampo.

Por lo anterior, concluimos que la expresión sostenida de *Arc* no se debe a la prolongación de la vida del gen en las células ni tampoco está asociado a una activación circádica, sino que, se debe a un evento de transcripción sostenida de *Arc* que se da en respuesta a la exploración. Lo anterior es un resultado bastante fructuoso para nosotros, dado que, hasta ahora no se sabía cual era el mecanismo a través del cual *Arc* permanecía en las células granulares del GD por un tiempo tan prolongado.

Ahora bien, dado que solo el 50% de las células presenta el transcrito tanto en el núcleo como en el citoplasma, y las proporciones de células con el transcrito ya sea en el núcleo o en el citoplasma tiende a fluctuar, pero, el total de células activadas es estable por 8 horas, es posible que las células inicien la transcripción y la apaguen transitoriamente y luego la vuelvan a iniciar. Para corroborar esto sería ideal monitorear la expresión de *Arc* en el hipocampo del animal vivo, durante las 8 horas después de la exploración, lo cual se podría lograr con métodos novedosos como el descrito por Wang y col. (2006) en el que con una construcción transgénica, en la que se inserta la proteína verde fluorescente junto a la región del ADN que ocupa el gen *Arc*, permite el monitoreo con microscopia confocal multifotónica de la expresión de *Arc* en el cerebro vivo.

Si bien, pudiéramos pensar que nuestros datos sugieren que esta transcripción se trata de un mecanismo celular, en el que las neuronas granulares del GD mantienen activa la transcripción de *Arc* durante esta ventana temporal. Es posible que este evento de sostenimiento en la expresión de *Arc* esté asociado con actividad sostenida de los circuitos de la red cortico-hipocampal, dando lugar a una continua estimulación de las células granulares. Para determinar si esta transcripción sostenida es un evento celular autónomo o bien es un evento relacionado con la actividad de la red, es necesario realizar un monitoreo electrofisiológico de la actividad de las células granulares después de la exploración. Sin embargo, los datos en la literatura muestran que las células granulares también presentan actividad en respuesta al lugar, como las células piramidales en los cuernos de Ammon (Jung y McNaughton, 1993). Más aun, datos preliminares obtenidos en este estudio, en los que evaluamos la posible expresión sostenida de otros genes tempranos, mostraron que tanto c-Fos, Zif268 y Homer 1a no se expresan sostenidamente en el giro dentado después de la exploración. Esto apoya la idea de que se trata de un evento autónomo de la célula, pues de tratarse de actividad en el circuito, todos los otros genes tenderían a expresarse

sostenidamente. Aunque también existe la posibilidad de que la experiencia modificara el umbral de inducción de *Arc* haciéndolo más sensible y los otros no. En resumen, se necesita más investigación para entender cabalmente los mecanismos que subyacen esta transcripción sostenida de *Arc*.

Lo que resulta muy interesante es que se ha sugerido que puede existir una ventana temporal en la que se requiere de la continua transcripción de *Arc* para completar procesos de plasticidad en las dendritas (Bramham y Messaoudi, 2005). Dichos autores, sugieren que la regulación en la expresión de este gen está relacionada con formas de reducción o expansión en la ventana temporal de consolidación de los cambios plásticos a nivel sináptico. Con nuestros datos podemos sugerir que el periodo de tiempo que dura la transcripción sostenida de *Arc*, inducida por la exploración espacial, que es de alrededor de 8 horas, sería más o menos el tiempo que se requiere para llevar a cabo dichos cambios plásticos a nivel postsináptico.

Otro punto importante es que *Arc*, como ya mencionamos, presenta una alta homología con las proteínas α -espectrina y con F-actina (Lyford et al., 1995), y la interacción de *Arc* con estas moléculas por 8 horas continuas, podría representar un elemento importante para los mecanismos que subyacen la plasticidad estructural, por lo que podemos sugerir que una de las funciones de la transcripción sostenida de *Arc* pudiera estar relacionada con la plasticidad estructural de las dendritas donde se alojan estas proteínas.

Otro mecanismo plástico que pudiera ser beneficiado por la presencia sostenida de *Arc* es el escalamiento sináptico (Shepherd, 2006), del cual depende el mantenimiento de cambios en la eficiencia sináptica como la PLP. Por estas razones la transcripción sostenida de *Arc* por un periodo de 8 horas podría ser un proceso relevante no solo para la consolidación de cambios plásticos, como lo sugieren Bramham y Messaoudi (2005), sino también para la consolidación de la memoria espacial, la cual al parecer tiene una ventana temporal considerablemente semejante (Knowlton, 1985).

Es importante mencionar, que los datos preliminares del análisis de la transcripción sostenida de *Arc* en el hipocampo, sugieren que ésta ocurre exclusivamente en el GD.

Por estas razones, podemos sugerir que este fenómeno que ocurre en el GD, pudiera ser una importante base molecular para la consolidación de la memoria espacial y posiblemente para toda la memoria episódica. Esto permitiría garantizar la permanencia (en el periodo temporal en el que se observa) de cambios moleculares en ese grupo de células granulares, que podrían resultar en modificaciones en la eficiencia sináptica, lo que permitiría la estabilización de los ensambles de representación de la información espacial o episódica asociada a la experiencia del animal (Hebb, 1949), para así mantenerla a largo plazo.

Por lo que la expresión de este tipo de cambios plásticos, que se presentan después de una conducta exploratoria, están cumpliendo alguna función en la célula, y recurriendo a la teoría, se sugiere que dicha función podría ser la de estabilizar la respuesta del ensamble, particularmente en aquellas células que formarán parte de los ensambles de representación a largo plazo, es decir, aquellas que expresan sostenidamente *Arc*.

Por otra parte, el análisis de estos resultados concuerda con lo propuesto por la teoría de Maturana y Varela (2003), que plantea una continua interacción entre el organismo y su medio, donde el SNC se propone como dinámico y en continua transformación como una forma de mantener la congruencia con las transformaciones del medio, donde cada interacción lo afecta a distintos niveles, es decir, se presentan modificaciones que incluyen diferentes cambios en el metabolismo celular, y éstos a su vez, modifican las conexiones que dicha célula tenga, lo que resulta en una deriva estructural continua que sigue el curso en el que en cada instante se conserva el acoplamiento estructural (adaptación) del organismo a su medio de interacción, dando como resultado el proceso de "cognocere". Así, podemos ver que, independientemente de la postura que se tome (representacionista o no), existe un cambio en el SNC como consecuencia de una conducta (en este caso exploratoria), es decir, como resultado de la interacción, y ese proceso de cambio presenta características particulares en el organismo, como las que nosotros describimos en el caso particular de *Arc* y las células granulosas del GD; sin embargo, aun no podemos jactarnos de que efectivamente esté sucediendo el proceso de "cognocere" o de consolidación de la representación.

Es importante considerar que aunque cada trabajo aporte resultados relevantes para las teorías fisiológicas del aprendizaje y la memoria, siempre se debe de tener en cuenta que ningún conocimiento es absoluto, ni estático, sino un

fenómeno constructivo y totalmente dinámico, que requiere de la constante integración de nuevos datos y teorías, de la retroalimentación permanente; así como también, de la actualización y cuestionamiento de sus bases teóricas y metodológicas, pues es la base para no adoptar dogmas. Por lo anterior, los resultados obtenidos son fructuosos para nosotros y al mismo tiempo constituyen un eslabón en la cadena del conocimiento, un eslabón que resulta útil y que puede interpretarse con diferentes ópticas.

Bibliografía

- Abrous DN.; Koehl M. ; Le Moal M. (2005); *Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology*. *Physiol Rev.* 2005 Apr;85(2):523-69.
- Afifi AK; Bergman RA. (1999); *Neuroanatomía Funcional*; Madrid. McGraw Hill. pp 429-431.
- Alberts B.; Bray D; Lewis J; Raff M; Roberts K; Watson J. (1994); *Molecular Biology of the cell*. -3rd ed.- New York. pp.82-87.
- Amaral DG; Witter MP. (1989); *The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data*. *Neuroscience*; 31(3):571-91.
- Barco A; Bailey CH; Kandel ER. (2006); *Common molecular mechanisms in explicit and implicit memory*. *J Neurochem.* 97 (6):1520-33.
- Barlow HB. (1972); *Single units and sensation: a neuron doctrine for perceptual psychology?* *Perception*; 1(4):371-94.
- Barnes CA; McNaughton BL; Mizumori SJ; Leonard BW; Lin LH. (1990); *Comparison of spatial and temporal characteristics of neuronal activity in sequential stages of hippocampal processing*. *Prog. Brain Res.* 83:287–300.
- Bear MF. (1996); *A synaptic basis for memory storage in the cerebral cortex*. *Proc Natl Acad Sci USA*; 93(24):13453-9.
- Berke RF; Paletzki GJ; Aronson SE; Hyman SE; Gerfen CR. (1998); *A complex program of striatal gene expression induced by dopaminergic stimulation*. *J Neurosci* 18 (14):5301-10.
- Bliss TV; Lomo T. (1973); *Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path*. *J Physiol.* 232(2):331-56.
- Bramham CR; Messaoudi E. (2005); *BDNF function in adult synaptic plasticity: The synaptic consolidation hypothesis*. *Progress in Neurobiology* 76:99–125.
- Cavazzini M; Bliss T; Emptage N. (2005); *Ca²⁺ and synaptic plasticity*. *Cell Calcium*;38(3-4):355-67.
- Cavazos JE; Sutula TP. (1990); *Progressive neuronal loss induced by kindling: a possible mechanism for mossy fiber synaptic reorganization and hippocampal sclerosis*. *Brain Res*; 527(1):1-6.
- Cirelli C; Tononi G. (2000); *Differential expression of plasticity-related genes in waking and sleep and their regulation by the noradrenergic system*. *J Neurosci*; 20(24):9187-94.

Cooke SF; Bliss TV. (2006); *Plasticity in the human central nervous system*. Brain; 129(Pt 7):1659-73

Chawla MK; Guzowsky JF; Ramirez-Amaya V; Lipa P; Hoffman KL; Marriott LK; Worley PF; McNaughton BL; Barnes CA. (2005); *Sparse, environmentally selective expression of RNA in the upper blade of the rodent fascia dentata by brief spatial experience*. Hippocampus 15:579-586.

Chklovskii DB; Mel BW; Svoboda K. (2004); *Cortical rewiring and information storage*. Nature; 431(7010):782-8.

Chowdhury S; Shepherd JD; Okuno H; Lyford G; Petralia RS; Plath N; Kuhl D; Huganir RL; Worley PF. (2006); *Arc/Arg3.1 interacts with the endocytic machinery to regulate AMPA receptor trafficking*. Neuron; 52(3):445-59.

Cooke SF; Bliss TV. (2006); *Plasticity in the human central nervous system*. Brain; 129(Pt 7):1659-73.

Daoudal G; Debanne D. (2003); *Long-term plasticity of intrinsic excitability: learning rules and mechanisms*. Learn Mem; 10(6):456-65.

Donai H; Sugiura H; Ara D; Yoshimura Y; Yamagata K; Yamauchi T. (2003); *Interaction of Arc with CaM kinase II and stimulation of neurite extension by Arc in neuroblastoma cells expressing CaM kinase II*. Neurosci Res; 47(4):399-408.

Escobar ML.; Alcocer I.; Chao V.; (1999); *The NMDA receptor antagonist CPP impairs conditioned taste aversion and insular cortex long-term potentiation in vivo*. Brain Res; 812(1-2):246-51.

Fagni L; Worley PF; Ango F. (2002); *Homer as both a scaffold and transduction molecule*. Sci STKE; 2002(137): REV.

Fields RD; Lee PR; Cohen JE. (2005); *Temporal integration of intracellular Ca²⁺ signaling networks in regulating gene expression by action potentials*. Cell Calcium; 37(5):433-42.

Fischer M; Kaech S; Knutti D; Matus A. (1998); *Rapid actin-based plasticity in dendritic spines*. Neuron; 20(5):847-54.

Gazzaniga MS. (2000); *The cognitive Neurosciences*. pp. 171-189.

Gill KM; Bernstein IL; Mizumori SJ. (2007); *Immediate early gene activation in hippocampus and dorsal striatum: effects of explicit place and response training*. Neurobiol Learn Mem; 87(4):583-96.

Gothard KM; Hoffman KL; Battaglia FP; McNaughton BL. (2001); *Dentate gyrus and CA1 ensemble activity during spatial reference frame shifts in the presence and absence of visual input*. J Neurosci 21:7284 –7292.

Guzowski JF; McNaughton BL; Barnes CA; Worley PF; (1999); *Environment-specific expression of the immediate-early gene Arc in hippocampal neuronal ensembles*. Nat Neurosci 2:1120-4.

Guzowski JF; Lyford GL; Stevenson GD; Houston FP; McGaugh JL; Worley PF; Barnes CA. (2000); *Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory*. J Neurosci 20:3993-4001.

Hebb D. (1949); *The organization of behavior; A neuropsychological theory*".New York: J. Wiley. pp. 38-41, 60-74, 79-100.

Jeffery KJ; Hayman R. (2004); *Plasticity of the hippocampal place cell representation*.Rev Neurosci;15(5):309-31.

Jung MW; McNaughton BL. (1993); *Spatial selectivity of unit activity in the hippocampal granular layer*. Hippocampus; 3(2):165-82.

Kandel E; Schwartz JH; Jessell TM. (2001); *Principles of Neural Science*. Nueva Cork. pp.1232-1237, 1254-1267 y 1264.

Knowlton B; McGowan M; Olton DS. (1985); *Hippocampal stimulation disrupts spatial working memory even 8h after acquisition*. Behav Neural Biol; 44(2):325-37.

Kesner RP; Lee I; Gilbert P.(2004); *A behavioral assessment of hippocampal function based on a subregional analysis*. Rev Neurosci; 15(5):333-51.

Kreisel B; Conforti N; Gutnick M; Feldman S. (1978); *Suprachiasmatic nucleus responsiveness to photic and basal hypothalamic stimulation*. Brain Res Bull; 3(6):707-14.

Lanahan A; Worley P. (1998); *Immediate-early genes and synaptic function*. Neurobiol Learn Mem 70:37-43.

Lashley KS. (1937); *Functional determinants of cerebral localization*. Arch. Neurol. Psychiat; 38, 371–387.

Lendvai B; Stern EA; Chen B; Svoboda K. (2000); *Experience-dependent plasticity of dendritic spines in the developing rat barrel cortex in vivo*. Nature; 404(6780):876-81.

Leutgeb S; Leutgeb JK; Treves A; Moser MB; Moser EI. (2004); *Distinct ensemble codes in hippocampal areas CA3 and CA1*. Science; 305(5688):1295-8.

Link W; Konietzko U; Kauselmann G; Krug M; Schwanke B; Frey U; Kuhl D. (1995); *Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity*. Proc Natl Acad Sci USA 92:5734 –5738.

Lorente de No R. (1949); *Cerebral cortex: architecture, intracortical connections, motor projections*. Physiology of the nervous system, Oxford University Press. 3rd ed. pp. 288–330.

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

Martinez JL Jr; Derrick BE. (1996); *Long-term potentiation and learning*. Annu_Rev Psychol; 47:173-203.

Marr D. (1945); *Vision: a computational investigation into the human representation and processing of visual information*. USA pp. 99-111, 155-159.

Marr D. (1976); *Early processing of visual information*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci; 275(942):483-519.

Maturana H.; Varela, F. (1994); *De máquinas y seres vivos: autopoiesis, la organización de lo vivo*. Lumen 1^a ed. Santiago de Chile. pp.69-75, 79-82, 88-92,106-109,121-132.

Maturana H.; Varela, F.(2003); *El árbol del conocimiento: las bases biológicas del entendimiento humano*. Lumen 1^a ed. Buenos Aires. pp.19-31, 50-58,92-117.

McGaugh JL. (1999); *The perseveration-consolidation hypothesis: Mueller and Pilzecker*; Brain Res Bull. 50:445-6.

McGaugh JL. (2000) *Memory a century of consolidation*. Science; 287(5451):248-51.

McNaughton BL; Barnes CA; Meltzer J; Sutherland RJ. (1989); *Hippocampal granule cells are necessary for normal spatial learning but not for spatially-selective pyramidal cell discharge*. Exp Brain Res. 76:485-96.

McNaughton BL; Mizumori SJ; Barnes CA; Leonard BJ; Marquis M; Green EJ. (1994) *Cortical representation of motion during unrestrained spatial navigation in the rat*. Cereb Cortex 4:27–39.

McNaughton BL; Barnes CA; Gerrard JL; Gothard K; Jung NW; Knierim JJ; Kudrimoti H; Qin Y; Skaggs WE; Suster M; Weaver KL. (1996); *Deciphering the hippocampal polyglot: the hippocampus as a path integration system*. J Exp Biol 199:173–185.

Milner B. (1972); *Disorders of learning and memory after temporal lobe lesions in man*. Clin Neurosurg; 19:421-46.

Milner B.; (2005); *The medial temporal-lobe amnesic syndrome*; Psychiatr Clin North Am; 28(3):599-611, 609.

Moga DE; Calhoun ME; Chowdhury A; Worley P; Morrison JH; Shapiro ML. (2004); *Activity-regulated cytoskeletal-associated protein is localized to recently activated excitatory synapses*. Neuroscience; 125(1):7-11.

Morgado I. (2005); *Psicobiología del aprendizaje y la memoria: fundamentos y avances recientes*. Rev Neurol; 40 (5): 289-297.

Morris RG; Anderson E; Lynch GS; Baudry M. (1986); *Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5*. Nature; 319(6056): 774-6.

Moser MB; Trommald M; Andersen P. (1994); *An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests the formation of new synapses*; Proc Natl Acad Sci U S A; 91(26):12673-5.

Moscovitch M; Nadel L; Winocur G; Gilboa A; Rosenbaum RS. (2006); *The cognitive neuroscience of remote episodic, semantic and spatial memory*. Curr Opin Neurobiol; 16(2):179-90.

Muller R. (1996); *A Quarter of a Century of Place Cells* Neuron, Vol. 17, 979–990.

Nishimura M; Yamagata K; Sugiura H; Okamura H. (2003); *The activity-regulated cytoskeleton-associated (Arc) gene is a new light-inducible early gene in the mouse suprachiasmatic nucleus*. Neuroscience; 116(4):1141-7

O'Keefe J, Dostrovsky J. (1971); *The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat*. Brain Res; 34(1):171-5.

O'Keefe J. (1976); *Place units in the hippocampus of the freely moving rat*. Exp Neurol 51:78-109.

O'Keefe J; Nadel L. (1978); *The Hippocampus as a Cognitive Map*. Oxford. Clarendon Press.

Pastalkova E; Serrano P; Pinkhasova D; Wallace E; Fenton AA; Sacktor TC. (2006); *Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP*. Science; 313(5790):1141-4.

Plath N; Ohana O; Dammermann B; Errington ML; Schmitz D; Gross C; Mao X; Engelsberg A; Mahlke C; Welzl H; Kobalz U; Stawrakakis A; Fernandez E; Waltereit R; Bick-Sander A; Therstappen E; Cooke SF; Blanquet V; Wurst W; Salmen B; Bosl MR; Lipp HP; Grant SG; Bliss TV; Wolfer DP; Kuhl D. (2006); *Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories*. Neuron; 52(3):437-44.

- Qin YL; McNaughton BL, Skaggs WE, Barnes CA. (1997); *Memory reprocessing in corticocortical and hippocampocortical neuronal ensembles*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci; 352(1360):1525-33.
- Ramirez-Amaya V, Escobar ML, Chao V, Bermudez-Rattoni F. (1999); *Synaptogenesis of mossy fibers induced by spatial water maze overtraining*. Hippocampus; 9(6):631-6.
- Ramírez-Amaya V; Balderas I; Sandoval J; Escobar ML; Bermudez-Rattoni F. (2001); *Spatial long-term memory is related to mossy fiber synaptogenesis*. J Neurosci; 21(18):7340-8.
- Ramirez-Amaya V; Vazdarjanova A; Mikhael D; Rosi S; Worley PF; Barnes CA. (2005); *Spatial exploration-induced Arc mRNA and protein expression: evidence for selective, network-specific reactivation*. J Neurosci 25(7):1761-68.
- Ramirez-Amaya V; Marrone DF; Gage FH; Worley PF; Barnes CA. (2006); *Integration of new neurons into functional neural networks*. J Neurosci.;26(47):12237-41.
- Ramirez-Amaya V. (2007); *Molecular Mechanisms of Synaptic Plasticity Underlying Long-Term Memory Formation En: "Neural Plasticity and Memory: From genes to brain imaging"*. Ed. por Federico Bermudez-Rattoni. Edit. Taylor & Francis Group, LLC. Boca Raton FL USA. pp.47-59.
- Ramon y Cajal S. (1983); *Estructura del asta de Ammon y fascia dentada*. Anales de la Sociedad Española de Historia Natural. Tomo XXII.
- Rial Verde EM; Lee-Osbourne J; Worley PF; Malinow R; Cline HT. (2006); *Increased expression of the immediate-early gene arc/arg3.1 reduces AMPA receptor-mediated synaptic transmission*; Neuron.;52(3):461-74.
- Rogan MT ; Staubli UV ; LeDoux JE. (1998); *Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdale*; 390(6660):604-7. Erratum in: Nature; 391(6669):818.
- Riedel G; Casabona G; Reymann KG. (1995); *Inhibition of long-term potentiation in the dentate gyrus of freely moving rats by the metabotropic glutamate receptor antagonist MCPG*. J Neurosci; 15(1 Pt 1):87-98.
- Rosenzweig MR; Krech D; Bennett EL; Zolman JF. (1962); *Variation in environmental complexity and brain measures*. J Comp Physiol Psychol; 55:1092-5.
- Rosenzweig M; Leiman A; Breedlove S. (2001); *Psicología Biológica. Una introducción a la Neurociencia conductual, cognitiva y clínica*. Ed. Ariel. Barcelona .pp. 8-10.

Rosi S; Ramirez-Amaya V; Vazdarjanova A; Worley PF; Barnes CA; Wenk GL. (2005); *Neuroinflammation alters the hippocampal pattern of behaviorally induced Arc expression*. J Neurosci; 25(3):723-31.

Rusak B; Groos G. (1982); *Suprachiasmatic stimulation phase shifts rodent circadian rhythms*. Science; 215(4538):1407-9.

Sakurai Y. (1999); *How do cell assemblies encode information in the brain?* Neuroscience and Biobehavioral Rev. 23:785-796.

Shapiro ML; Eichenbaum H. (1999); *Hippocampus as a memory map: synaptic plasticity and memory encoding by hippocampal neurons*; Hippocampus; 9(4):365-84.

Shepherd JD; Rumbaugh G; Wu J; Chowdhury S; Plath N; Kuhl D; Huganir RL; Worley PF. (2006); *Arc/Arg3.1 mediates homeostatic synaptic scaling of AMPA receptors*. Neuron; 52(3):475-84.

Sherrington CS. (1906); *The integrative action of nervous system*. New Haven, Yale University Press.

Shors TJ; Miesegans G; Beylin A; Zhao M; Rydel T; Gould E. (2001); *Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories*. Nature; 410(6826):372-6.

Steward O; Wallace CS; Lyford GL; Worley PF. (1998); *Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites*. Neuron 21:741–751.

Steward O; Worley PF. (2001); *Selective targeting of newly synthesized Arc mRNA to active synapses requires NMDA receptor activation*. Neuron 30:227–240.

Steward O; Schuman EM. (2003); *Compartmentalized synthesis and degradation of proteins in neurons*. Neuron;40(2):347-59.

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

Toni N; Buchs PA; Nikonenko I; Bron CR; Muller D. (1999); *LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite*; Nature; 402(6760):421-5.

Vazdarjanova A; McNaughton BL; Barnes CA; Worley PF; Guzowski JF. (2002); *Experience-dependent coincident expression of the effector immediate-early genes arc and Homer 1a in hippocampal and neocortical neuronal networks*. J Neurosci 22:10067–10071.

Vazdarjanova A.; Guzowski JF.; (2004); *Differences in hippocampal neuronal population responses to modifications of an environmental context: evidence*

for distinct, yet complementary, functions of CA3 and CA1 ensembles. J Neurosci. 24:6489-96.

Waltereit R; Dammermann B; Wulff P; Scafidi J; Staubli U; Kauselmann G; Bundman M; Kuhl D. (2001); *Arg3.1/Arc mRNA induction by Ca²⁺ and cAMP requires protein kinase A and mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase activation;* J Neurosci; 21(15):5484-93.

Wang KH; Majewska A; Schummers J; Farley B; Hu C; Sur M; Tonegawa S. (2006); *In vivo two-photon imaging reveals a role of arc in enhancing orientation specificity in visual cortex.* Cell; 126(2):389-402.

Weeks AC; Ivanco TL; Leboutillier JC; Racine RJ; Petit TL. (1999); *Sequential changes in the synaptic structural profile following long-term potentiation in the rat dentate gyrus: I. The intermediate maintenance phase;* Synapse; 31(2):97-107.

Weeks AC; Ivanco TL; Leboutillier JC; Racine RJ; Petit TL. (2000); *Sequential changes in the synaptic structural profile following long-term potentiation in the rat dentate gyrus. II. Induction/early maintenance phase.* Synapse; 36(4):286-96.

Weeks AC; Ivanco TL; Leboutillier JC; Racine RJ; Petit TL. (2001); *Sequential changes in the synaptic structural profile following long-term potentiation in the rat dentate gyrus: III. Long-term maintenance phase;* Synapse. 2001 Apr; 40(1):74-84.

Whitlock JR; Heynen AJ; Shuler MG; Bear MF. (2007); *Learning Induces Long-Term Potentiation in the Hippocampus;* Science; 313:1093-1097.

Worley PF; Cole AJ; Saffen DW; Baraban JM. (1990); *Regulation of immediate early genes in brain: role of NMDA receptor activation;* Prog Brain Res; 86:277-85.