



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

PLASTICIDAD SINÁPTICA DE LAS FIBRAS MUSGOSAS EN LOS
ESTRATOS *LUCIDUM* Y *ORIENS* DEL CA3 HIPOCÁMPICO EN LA
RATA ADULTA MADURA, SOMETIDA A SOBRE ENTRENAMIENTO.

TESIS

Que para obtener el grado de
Maestra en Ciencias (Neurobiología)

Presenta:

Q. B. P. ARACELI ANA MARÍA SÁNCHEZ MARTÍNEZ

Directora de la Tesis

DRA. SOFÍA Y. DÍAZ MIRANDA

CAMPUS JURIQUILLA UNAM, QUERÉTARO, JUNIO, 2008.



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.

AGRADECIMIENTOS:

Con el presente trabajo y tras un largo proceso llega la culminación de una etapa de mi vida, la cual no se hubiese logrado sin el apoyo y comprensión de tutores, amigos y familiares, por lo cual deseo expresar mi agradecimiento:

A la Dra. Sofía Díaz, por sus valiosas enseñanzas, por su apoyo y sobretodo por su paciencia.

A mi comité tutorial integrado por los Drs. Manuel Salas Alvarado, Araceli Díaz, Víctor Ramírez Amaya y Gina Quirarte por sus aportaciones y sus atinados comentarios para la revisión de esta tesis.

A Azucena Aguilar, por ser una gran amiga en los momentos de más necesidad.

Leticia Granados Rojas, Tonantzin Pineda y Uriel León Jacinto por su colaboración durante mi estancia en el laboratorio.

A Leonor Casanova Rico y al personal del posgrado en especial a Yolanda por su disposición y apoyo en todos los trámites realizados en la maestría. A la Lic. María del Pilar Galarza Barrios y al personal de la Biblioteca, por las facilidades del uso del acervo bibliográfico proporcionado. Al M.V.Z. Martín García por el apoyo técnico para el manejo de los sujetos de estudio, las ratas.

A mis amigos y compañeros de la UVM por su amistad y comprensión en el camino andado

A mis padres, Carmen y Candido cuyo ejemplo de responsabilidad y tenacidad me han hecho capaz de continuar adelante

A mi hermanos Hilda, Alfonso, Eva y Salvador con cariño

Y sobre todo a mis hijos, Hugo Alberto y Aura Aline, ya que ellos son mi fortaleza más grande por su apoyo incondicional tanto en mis triunfos como en mis fracasos y por el simple hecho de ser mis hijos

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al programa de apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del personal Académico (DGAPA), UNAM. IN205206.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

“La constancia es la virtud por la que todas las obras dan fruto”.

Arturo Graf

	PÁGINAS
INDICE	i
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1. FORMACION HIPOCAMPICA (FH)	5
II.1.1. Organización	5
II.2. HIPOCAMPO	6
II.2.1. Interconexiones del intracircuito	8
II.2.2. Participación en los procesos de aprendizaje y memoria espacial e identificación de las "células de lugar" en el hipocampo	8
II.2.3. El hipocampo y su relación con la potenciación a largo plazo (LTP) y la de potenciación a largo plazo (LDP)	10
II.2.3.1. Memoria espacial y LTP	10
II.2.3.2. Memoria, glutamato y los receptores del <i>N-metil-D-aspartato</i> (NMDA)	11
II.2.4. Plasticidad neuronal (neurogénesis) y sináptica (axogénesis y espinogénesis)	12
II.2.5. Cambios celulares del hipocampo por estrés, hipoestriogenismo y envejecimiento	13
II.2.5.1 Navegación espacial	15
II.2.6. Hipocampo y sistema de fibras musgosas (FM)	16
II.2.7. Cambios moleculares asociados a la axogénesis y sinaptogénesis	17
II.2.8. El sistema de FM	18
II.2.8.1. Anatomía de las FM	19
II.3. SINAPSIS DE LAS FM CON CÉLULAS EXCITATORIAS E INHIBITORIAS DEL HILUS Y DEL CA3	20
II.3.1. Patrón sináptico y morfología de las FM	21
II.3.2. Papel funcional de la FM	24
II.3.3. Axogénesis de las FM	25
II.3.4. Patrón de estabilidad sináptica entre la FM y el CA3 en el hipocampo senil	26

III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27
IV.	PARTE EXPERIMENTAL	27
IV.1.	HIPÓTESIS	27
IV.2.	OBJETIVO GENERAL	27
IV.2.1.	Objetivos particulares	27
V.	MATERIAL Y MÉTODOS	28
V.1.	Sujetos	28
V.2.	Grupos de estudio conductual	28
V.3.	Entrenamiento de tipo espacial	29
V.3.1.	Entrenamiento	29
V.4.	Estudio histológico y de morfometría esterológica	30
V.4.1.	Corte y tinción (Timm)	31
V.4.2.	Análisis estereológico	33
V.5.	Análisis estadístico	34
VI.	RESULTADOS	35
VI.1.	Conductuales	35
VI.1.1.	Aprendizaje	36
VI.1.2.	Memoria	36
VI.2.	Análisis anatómico de las FM en los estratos <i>lucidum</i> y <i>oriens</i>	37
VI.2.1.	Análisis morfométrico del área de las FM en los estratos <i>lucidum</i> y <i>oriens</i>	37
VI.2.2.	Área total medida del estrato <i>oriens</i> en los 4 grupos experimentales	38
VII.	DISCUSION	40
VIII.	CONCLUSIONES	46
IX.	REFERENCIAS	47
X.	INDICE DE FIGURAS Y GRAFICAS	55

RESUMEN

El hipocampo es un área cerebral que tiene un papel importante en la memoria y en los procesos de aprendizaje. En los roedores, se incrementa el crecimiento de las fibras musgosas (FM) de las células granulares del giro dentado, debido al entrenamiento o al sobreentrenamiento en el laberinto acuático de Morris (LAM). Las FM, son un plexo axogénico importante en el cual el fenómeno de plasticidad es utilizado para hacer estudios sistemáticos debido a alta sensibilidad para producir modificaciones anatómicas y funcionales. Nosotros estudiamos animales machos adultos maduros de 230 días de edad, con o sin entrenamiento espacial y el área de FM en ambos estratos *lucidum* y *oriens* del CA3 hipocampal. Se hicieron tres grupos experimentales: control de nado; y dos grupos entrenados; en dos días (LAM2) y cuatro días (LAM4). Todos los grupos se compararon con el grupo control intacto (CI). Cada sesión del LAM consistió de 10 ensayos y el aprendizaje se consideró cuando el animal llegó a la plataforma de escape. El área de las FM en los estratos *lucidum* como el crecimiento del *oriens* en el CA3 del hipocampo fue medido en el lado derecho del hipocampo teñido con la técnica de Timm (zinc indicador de las FM) en 10 secciones de 50 micras de grosor en cada animal (n=6) y condición experimental (cuatro grupos), usando el sistema digital de imágenes Biocom. En cada corte se delimitó el área en ambos estratos (*lucidum* y *oriens*) y los datos esterológicos se analizaron con la prueba de ANOVA. Los resultados indican que los animales adultos maduros aprendieron la tarea en la segunda sesión (LAM2) por la reducción de la latencia de llegada en un 30% ($P<0.002$) en los ensayos, 5 al 10. En el cuarto día (LAM4) la latencia en los ensayos del 7 al 10, se redujo en un 75% ($P<0.0001$). La memoria se analizó con el ANOVA de medidas repetidas, encontrando diferencias significativas ($P<0.001$) en la latencia entre el día primero (LAM1) y los días 2 (LAM2) y 4 (LAM4). El análisis *post hoc* de Scheffe mostró una disminución del 41.67% ($P<0.003$) entre el LAM1 y el LAM2 y del 67.3% ($P<0.0001$) del día LAM4 con respecto al LAM1. El área ocupada de las FM en el *lucidum* es mayor que la del *oriens* en todos los grupos analizados y las comparaciones entre los grupos mostraron aumentos significativos ($P<0.0001$) en los dos grupos entrenados (LAM2) y sobre entrenados (LAM4). También, en el *oriens* mostró diferencias significativas ($P<0.0035$) entre los grupos. El análisis *post hoc* con la prueba de Sheffe mostró un incremento del 57.89% significativo ($P<0.004$) del grupo CN y de los grupos LAM2 y LAM4 con incrementos del 136.84% ($P<0.0001$) y 126.87% ($P<0.0001$), respectivamente con respecto al CI. Las comparaciones de los grupos LAM2 y LAM4 con respecto al grupo CN fueron aumentos del 50% ($P<0.0001$) y del 43.3% ($P<0.0004$), respectivamente. Estas observaciones confirman que las ratas adultas maduras, muestran un sustrato anatómico estable y la plasticidad funcional axogénica de las FM es debida a la generación de nuevas células granulares que proyectan nuevos axones o por el incremento en el crecimiento de las FM de las células granulares originales. En ambos casos las FM proyectan hacia las células piramidales del CA3 aumentando el área de las FM principalmente en el estrato *oriens*.

ABSTRACT

The hippocampus is one of the brain areas which have an important role in memory as well as learning processes. In rodents, their mossy fibers (MF) grow from the dentate gyrus granular cells and increase due to training or over-training tasks in the Morris water maze (MWM). The MF is an important axogenic plexus in which the plasticity phenomenon is used to make systematic studies due to its higher sensitivity to produce anatomic and functional modifications. We study adult mature male animals of 230 days old, with or without spatial training, and their MF area in both strata *lucidum* and *oriens* from CA3 hippocampus. Three experimental groups were made: swimming control (SC) and two trained groups: training in two days (MWM2) and over training in 4 days (MWM4). All these groups were compared to intact control groups (IC). Each MWM session was composed by 10 trials and learning was reported when the animal reached the platform in less time. The area of MF on the strata *lucidum* as well as the growth of the *oriens* in CA3 hippocampus was measured in the right-side hippocampus stained with the Timm technique (zinc indicator in the MF) in 10 sections of 50 microns of thickness for each animal (n=6) and experimental condition (four groups), using the Biocom digital system. In every section, the area of strata (*lucidum* and *oriens*) was defined and the stereological data were analysed using the ANOVA test. Results indicated that adult mature animals learned the test in the second session (MWM2) with a reduction of 30% of the time in which they arrived to the platform. It was statistically significant ($P < 0.002$) on 5 to 10 trials. The reduction of latency on day four (MWM4) was 75% on trials 7 to 10. Memory was analysed using ANOVA of repeated measures showing significant latency differences between one day (MWM1) in relation with MWM2 and MWM4. *Post hoc* analysis with the Scheffe test showed a significant reduction of 41.67% ($P < 0.003$) between MWM2 and MWM1, and also a significant 67.3% ($P < 0.0001$) reduction in the comparison between MWM4 and MWM1. The *lucidum* area of MF was higher in comparison with the *oriens* area in all groups. The statistical comparison between groups showed significant increases ($P < 0.0001$) in trained (MWM2) and over trained (MWM4) groups. Also, the *oriens* area, had a significant differences ($P < 0.0035$) in all groups. *Post hoc* analysis with the Scheffe test showed an increase of 57.89% ($P < 0.004$) of SC groups, and MWM2 and MWM4 the significant increments were 136.84% ($P < 0.0001$) and 126.87% ($P < 0.0001$), respectively in relation with IC group. The comparison between MWM2 and MWM4 in relation with SC was a significant increase of 50% ($P < 0.0001$) and 43.3% ($P < 0.0004$), respectively. These observations confirm that, adult mature rats showed a stable anatomical substrate and the plastic axogenic function of the MF is due to the granular cells neurogenesis which forms new MF or increase the growth of MF from the original granular cells. In both cases MF project to CA3 pyramidal cells increasing the MF area mainly in the *stratum oriens*.

I. INTRODUCCIÓN

Estudios de plasticidad neuronal y de remodelación en el cerebro adulto han mostrado que el hipocampo presenta un grado avanzado de plasticidad por ser un blanco estructural que responde de manera directa a cambios en el medio ambiente como el estrés, las hormonas sexuales y la edad. Dependiendo de las características de éstos, se pone a prueba la capacidad plástica del hipocampo. Así, es válido establecer estudios de relación anatomo-funcional en el hipocampo que permitan entender más acerca de los diversos mecanismos celulares involucrados en la memoria de tipo espacial tomando como sujetos experimentales a los roedores (Moser y Moser, 1998) que responden con cambios plásticos neuronales después de una experiencia de aprendizaje (Rusakov, Davies, Harrison, Richter-Levin, Bliss y Stewart, 1997). La prueba de memoria espacial medida a través de los laberintos de agua y el radial se usan como paradigma para investigar la participación del hipocampo en el aprendizaje y la memoria espacial (Crusio y Schwegler, 2005). Por otra parte, se sabe, que los animales que fueron sometidos a algún tipo de estrés durante su desarrollo, son incapaces de aprender y no consolidan la memoria en la vida adulta (Hosseini-Sharifabad y Hadinedoushan, 2007). La mayor parte de estas alteraciones se asocian de manera directa a deficiencias anatómicas en el hipocampo y los cambios se encuentran principalmente, en el metabolismo o bien en la duración de los procesos del desarrollo (Balderas, Ramírez-Amaya y Bermúdez-Rattoni, 2004) Una característica funcional del hipocampo, es ser hiperexcitable, es decir, estímulos débiles producen máxima respuesta aún después de que se suspende el estímulo (efecto kindling). La explicación a esta característica se sustenta en la distribución típica de sus células de proyección (glutamatérgicas), las cuales forman el circuito intra hipocámpico (Bortolotto, Lauri, Isaac y Collingridge, 2003). Los cambios de plasticidad celular, en el hipocampo, se les identifica como un crecimiento de yemas o brotes de los botones sinápticos, de espinas y ramas dendríticas efecto conocido en inglés como “sprouting” (Deller y Frotcher, 1997). Este crecimiento, se puede estudiar en el hipocampo dorsal cuando los animales son sometidos de manera experimental al kindling (Spigelman, Yan, Obenaus,

Lee, Wasterlain y Ribak, 1998) o bien a pruebas conductuales de sobreentrenamiento, ambos procedimientos experimentales producen un crecimiento exagerado e incluso ectópico o aberrante de los axones de las células granulares (las fibras musgosas, FM) que hacen sinapsis con neuronas del campo CA3 (Balderas, et al., 2004; Wang, Hu y Tsien 2006). Esta respuesta sináptica plástica, es provocada por un proceso de neurogénesis de las células granulares que forman nuevos axones (axogénesis) o bien por el crecimiento de los ya existentes para mantener la sinaptogénesis (Parent, Yu, Leibowitz, Geschwind, Sloviter y Lowenstein, 1997). Estudios en animales jóvenes sometidos a pruebas de sobreentrenamiento, confirman estos resultados solo en el hipocampo dorsal ya que las FM crecen más en la parte del estrato *oriens* en relación al *lucidum* del campo 3 (CA3) hipocámpico (Ramirez-Amaya, Escobar, Chao y Bermudez-Rattoni. 1999). Sin embargo, se desconoce si esta capacidad plástica se conserva en animales adultos maduros de 230 días de edad. Por lo tanto, en este estudio se valoraron los cambios anatómicos (efecto sprouting) en el hipocampo dorsal en animales sometidos o no a entrenamiento e incluso, al ser sobreentrenados. El presente trabajo, incluye la valoración anatómica utilizando la técnica de Timm, específica para el marcaje de las FM que llegan a los estratos *lucidum* y *oriens* del CA3. Considerando la división funcional del hipocampo, las comparaciones se efectúan en la parte dorsal y anterior del hipocampo en donde se recibe información derivada de las cortezas sensoriales. Es este sitio del hipocampo en donde se integra la información que permite la función de tipo navegación o espacial en estos animales (Moser y Moser 1998). Una vez ubicada esta zona en todos los grupos experimentales y por morfometría digitalizada se midió el área ocupada por el crecimiento de las FM, en ambos estratos (*lucidum* y *oriens*). Para evitar sesgos en el procedimiento se llevó a cabo el muestreo siguiendo el método estereológico descrito por Gundersen y Jensen (1987). Las comparaciones se hicieron entre todos los grupos experimentales y entre los estratos *lucidum* y *oriens*, para establecer el grado de crecimiento de las FM por el sobreentrenamiento en animales adultos.

II. ANTECEDENTES

El estudio de la neurobiología del aprendizaje y la memoria ha progresado notablemente por el avance progresivo de las neurociencias, que aportan un enfoque de los mecanismos neuronales implícitos en estas conductas y las áreas cerebrales en donde se integra de manera importante esta información. Estudios anatómicos en el sistema límbico, describen cambios en la estructura sináptica de diferentes estructuras como correlato de aprendizajes diversos y de la formación de la memoria (Leuner, Falduto y Shors, 2003; Stewart, Davies, Sandi, Kraev, Rogachevsky, Peddie, Rodriguez, Cordero, Donohue, Gabbott y Popov, 2005). Los cambios producidos son incrementos en el número de sinapsis, de espinas dendríticas y axones, entre otros (Balderas et al., 2004; Holtmaat, Trachtenberg, Wilbrecht, Shepherd, Zhang, Knott y Svoboda, 2005; Wang, et al., 2006), que ocurren como consecuencia de la actividad neuronal y son considerados como cambios en la plasticidad sináptica. Por lo que el estudio anatómico del sistema límbico es ideal para relacionar los cambios ocurridos durante pruebas conductuales y los mecanismos de plasticidad celular en el cerebro de mamíferos (O'Malley, O'Connell, Murphy y Regan, 2000). Lesiones en partes importantes del lóbulo temporal del SNC del hombre y los animales producen pérdida de la memoria reciente (Scoville y Milner, 2000). En las pruebas experimentales de lesiones electrolíticas en la amígdala, estructura límbica implicada en las conductas de estrés y modulación de la memoria, se ha encontrado alteración específica de la Potenciación a Largo Plazo (LTP por sus siglas en inglés) y de la memoria espacial (Kim, Koo, Lee y Han, 2005). En los roedores sometidos a una tarea de laberinto en forma de T la ejecución de la tarea se altera por la lesión límbica, el efecto se muestra cuando el recorrido se ubica en el brazo correcto del laberinto, en una segunda ocasión, está determinado por la respuesta en el primer recorrido, que requiere una memoria representativa del primero (Walton, Bannerman y Rushworth, 2002). Los animales con extirpación del hipocampo presentan gran dificultad para abandonar estrategias previas y son incapaces de resolver una tarea de tipo espacial, porque reflejan dificultad en la discriminación (Moser y Moser 1998; Clark, Broadbent y Squire, 2007). La mayor parte de las alteraciones se asocian de manera directa a deficiencias celulares y los cambios

se encuentran principalmente en el metabolismo o bien en la duración de los procesos del desarrollo celular. Además, existe cierta convergencia en los resultados de las pruebas de discriminación entre los pacientes amnésicos y los animales de experimentación (Zola-Morgan, Squire, Clower y Rempel 1993; Gold, Hopkins y Squire, 2006). En ambos, la formación de determinadas memorias está alterada, mientras que otro tipo de memorias se conserva. Así, el tipo de memoria que se altera es la representación o declarativa y la que se conserva es la de hábito o memoria precedente (Squire, 2004). En el hombre y la mayoría de los animales, cuyas necesidades de movimiento a través de diferentes territorios son indispensables, es necesaria una estrategia que ayude a formar representaciones espaciales amplias. Un sistema de navegación espacial que frecuentemente se utiliza es el cartográfico, que implica el aprendizaje y memoria de un lugar en el espacio a partir de pistas visuales que permiten la orientación y la dirección del traslado del organismo. El estudio de la orientación implica la codificación de la información espacial (aprendizaje), la consolidación y la capacidad para evocar (memoria). Para comprender cómo funciona este sistema de orientación y cómo se da su representación cerebral (en términos de aprendizaje y memoria), se han hecho estudios de casos en humanos y experimentos en modelos animales y se ha encontrado que existen células en el hipocampo que están implicadas en estas representaciones espaciales. Las neuronas piramidales (también llamadas células de lugar) localizadas en los campos CA1 y CA3 del hipocampo se activan cuando el organismo se encuentra de nuevo en un lugar anteriormente registrado (O'Keefe y Dostrovsky, 1971; Nadel y Eichenbaum, 1999). Por diversos hallazgos, las preguntas acerca del aprendizaje y la memoria espaciales se han visto orientadas a buscar respuestas en la plasticidad cerebral, que es el conjunto de los cambios ocurridos por la experiencia del individuo y que representan una adaptación del mismo al ambiente que se da en términos de generación de nuevas células (neurogénesis) o cambios en las conexiones anatómicas y funcionales de las células existentes (Gage, 2002). Los animales que son sometidos al entrenamiento en el laberinto acuático de Morris (LAM) muestran un incremento en el número de botones musgosos en el estrato *oriens* de las neuronas piramidales de la región de CA3 en el hipocampo (Ramírez-Amaya et

al., 1999); esto fue interpretado posteriormente como una sinaptogénesis de las fibras musgosas (FM) asociada al sobreentrenamiento en el LAM, lo cual ocurre en la región más septal del CA3 y al parecer está relacionado con una mejor ejecución en una prueba de memoria a largo plazo (Ramirez-Amaya, Balderas, Sandoval, Escobar y Bermúdez-Rattoni, 2001). Este fenómeno ha sido corroborado en un par de trabajos en los que se reporta que ratas de diferentes cepas, muestran sinaptogénesis de las FM en la región de CA3 del hipocampo observado tanto con la técnica de Timm como con otras de marcaje por inmunocitoquímica fluorescente (Holahan, Rekart, Sandoval y Routtenberg, 2006; Rekart, Sandoval y Routtenberg, 2007).

II.1. FORMACION HIPOCÁMPICA (FH)

Como modelo experimental la FH presenta varias ventajas para su estudio: 1) se conoce la organización e interconexión laminar; 2) participa en los procesos de aprendizaje y memoria espacial y se han identificado las células “de lugar” en el hipocampo; 3) se registra la potenciación a largo plazo (LTP); 4) presenta plasticidad neuronal (neurogénesis) y sináptica (axogénesis y espinogénesis); 5) responde al estrés y las alteraciones endocrinológicas con cambios en su estructura celular y 6) se le ha relacionado con degeneración neural debida a la edad, el estrés y enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer.

II. 1.1. Organización

La FH, se divide en 3 regiones: la corteza entorrinal; el complejo subicular (subiculum, pre y parasubiculum y el asta de Ammon (cornu de Ammon; CA o hipocampo) que a su vez se divide en tres áreas o campos CA1, CA2 y CA3 y el giro dentado (GD) (Figura 1), formados por neuronas piramidales y granulares, respectivamente y denominadas neuronas de proyección (Golgi tipo I que son glutamatérgicas (Figura 3). Las interneuronas locales (Golgi tipo II) son GABA_{érgicas} y se les localiza en todas las regiones del hipocampo. La distribución celular y organización de las interconexiones hipocámpales son laminares (formando estratos) y de tipo unidireccional, cuyo origen es la corteza adyacente entorrinal.

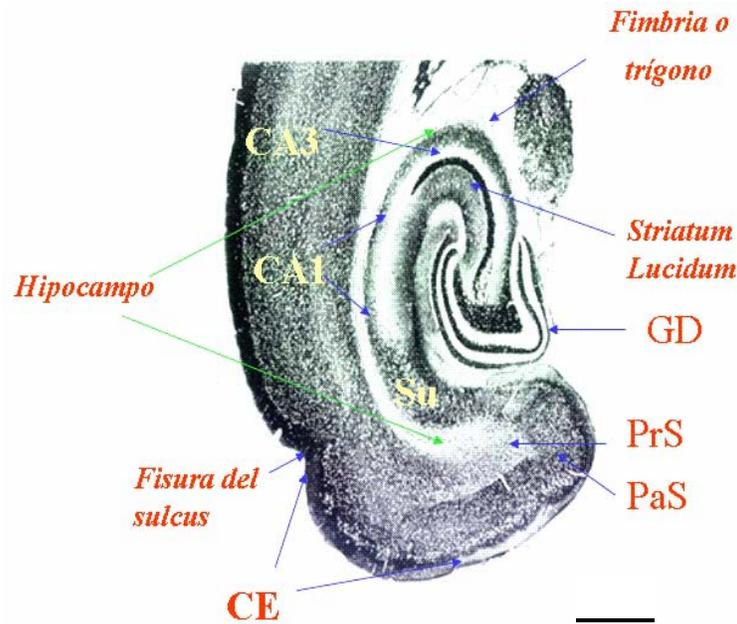


Figura 1. Corte horizontal de la formación hipocampal de la rata y sus divisiones: El complejo subicular (subiculum, Su; presubiculum, PrS y parasubiculum PaS). La corteza entorrinal (CE), el hipocampo (CA1 y CA3) y el giro dentado (GD). Esquema modificado de Ottersen, Torp y Storm-Mathisen (1989). La raya representa 200 μ m.

II.2. HIPOCAMPO

El hipocampo como parte del sistema límbico, se ubica en el cerebro de la rata en posición rostro-caudal desde los núcleos septales hasta el lóbulo temporal caudo-ventral (Figura 2) cuya porción dorsal y anterior recibe información derivada de las cortezas sensoriales. Como las rutas para el flujo de información están claramente definidas lo hace una estructura idónea para el estudio de la función sináptica. Las capas principales y las regiones anatómicas neuronales se definen por sus conexiones específicas y se distribuyen en las regiones del CA1 al CA4. En especial, el CA1 y el giro dentado se les emplea como un sistema típico para el estudio del desarrollo neurobiológico. Además, se sabe que su desarrollo morfogénico ocurre por gradientes, los cuales dependen de la diferenciación citológica y laminar o *strata* de las fibras aferentes que establecen conexiones con las distintas células, localizadas desde la parte externa a la interna: 1) estrato *alveole*, 2) estrato *oriens* o capa polimorfa, 3) estrato *piramidale*, 4) estrato *radiatum* o capa radial y, 5) estrato *lacunosum moleculare* (Figura 3).

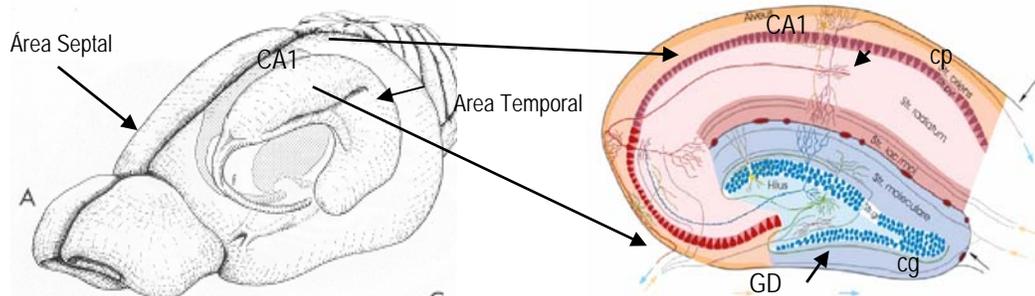


Figura 2. Hipocampo y su ubicación en el cerebro de la rata (A), y a la derecha un corte del hipocampo dorsal en donde se indican el giro dentado (GD) y el regio superior o campo 1, (CA1) cada uno con las células granulares (cg) y piramidales (cp), respectivamente (esquema modificado de Amaral y Witter., 1995).

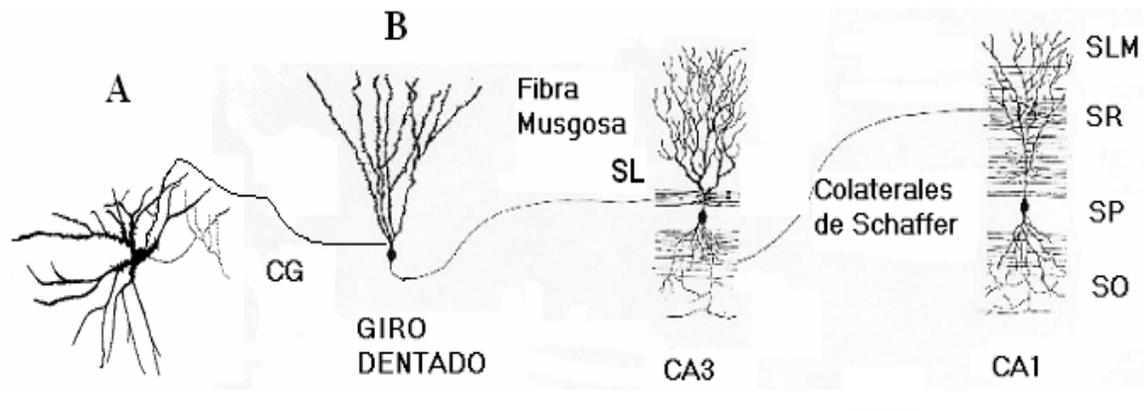


Figura 3. Células de proyección que forman parte del intracircuito del hipocampo. A, célula musgosa del hilus, B, célula granular (CG) del giro dentado de donde parte la fibra musgosa que hace sinapsis en el estrato *lucidum* (SL) de la célula piramidal del campo CA3, de esta célula parten las colaterales de Schaffer hacia el estrato *radiatum* (SR) de la célula piramidal (SP) del campo CA1, en donde se localizan también los estratos *oriens* (SO) y el *lacunosum moleculare* (SLM). La raya representa 100 μ m.

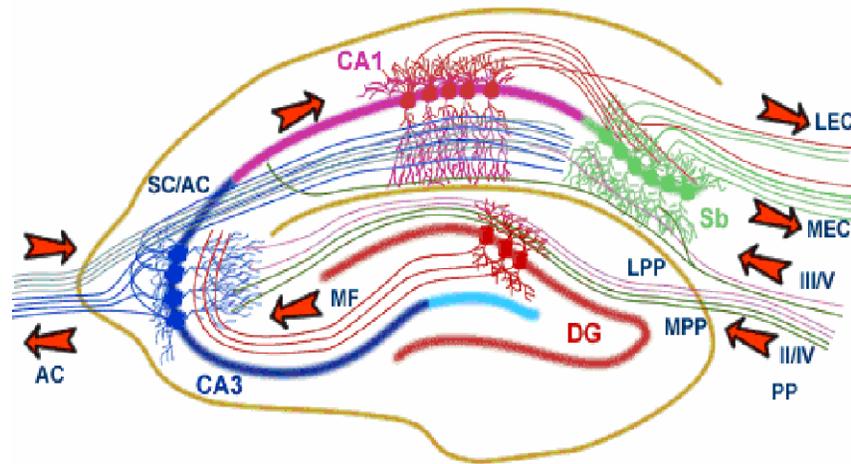


Figura 4. Circuito unidireccional del hipocampo de roedor. Se inicia con la entrada de los axones provenientes de las capas II/IV (MPP) del patrón perforante de la corteza entorrinal que hacen conexiones con el giro dentado (DG) y las células piramidales del CA3, las que también reciben entradas de las fibras musgosas (MF) provenientes de las células granulares. Las células piramidales del CA3 envían axones colaterales de Schaffer al CA1 (SC), el cual también envía axones de asociación comisural (AC) y recibe axones del patrón perforante (LPP) provenientes de la corteza entorrinal pero de la capas II/IV. Los axones de estas células van hacia el subiculum (Sb), que en turno envían axones de regreso hacia la corteza entorrinal lateral (LEC) y medial (MEC) (Modificado de Bortolotto et al., 2003).

II.2.1 Interconexiones del intracircuito

La entrada principal de la corteza al hipocampo se efectúa a través de la vía del patrón perforante (PP), en donde los axones del PP surgen de las capas II y III de la corteza entorrinal (CE), con menores contribuciones de las capas profundas IV y V. Los axones de las capas II y IV se proyectan a las células granulares del GD y a las piramidales de la región CA3, mientras que las proyecciones de las capas III y V van a las células piramidales del CA1 y el subiculum. El PP puede ser separado en fascículos lateral (LPP) y medial (MPP), dependiendo del origen de estas fibras (Figura 4) (Bortolotto, et al., 2003).

II.2.2. Participación en los procesos de aprendizaje y memoria espacial e identificación de las “células de lugar” en el hipocampo

Diversas experiencias sensoriales, pueden tener consecuencias plásticas en algunas estructuras cerebrales, también pueden afectar la adquisición de nuevas tareas. Por ejemplo, animales que habitan en ambientes sensoriales enriquecidos presentan incrementada la densidad de espinas dendríticas en el estrato *oriens* del CA1 del hipocampo al tiempo que muestran una mejor ejecución

en la tarea del laberinto acuático de Morris (LAM), (Moser, Trommald y Andersen, 1994). Para realizar los estudios de plasticidad cerebral en tareas espaciales dependientes del hipocampo, se han usado diversas pruebas además del LAM (Figura 5A), que consiste en un tanque circular con agua, ubicado en un cuarto con pistas en los cuatro ejes cardinales (Norte, Sur, Este y Oeste), con una plataforma colocada bajo el agua, para que la rata aprenda a escapar ubicándose solo con las pistas y el aprendizaje se considera el menor tiempo en el que lo logra. El laberinto radial de ocho brazos (Figura 5B) también ha sido usado como paradigma para investigar la participación del hipocampo en el aprendizaje y la memoria espacial (Becker, Walter y Olton, 1980; Crusio y Schwegler, 2005). Consiste en una plataforma con ocho pasillos y el animal se coloca en el centro y deberá aprender, mediante pistas visuales, en qué brazo se encuentra un reforzador.

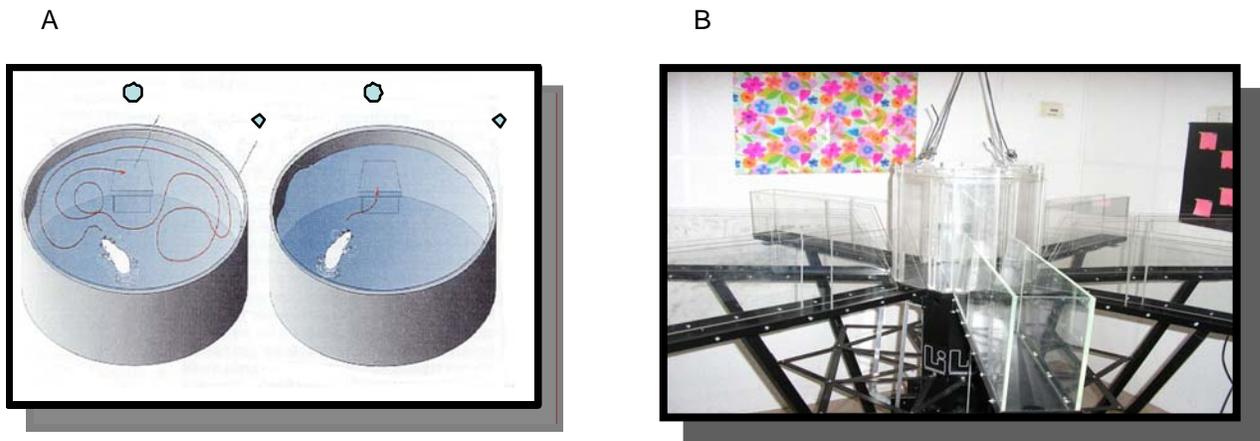


Figura 5. A, Laberinto acuático de Morris (LAM) y B, laberinto radial de 8 brazos.

Otra fuente que ha dado información acerca del papel del hipocampo en la memoria espacial es el estudio electrofisiológico de las “células de lugar” hipocampales, las cuales aumentan su tasa de descarga cuando el animal se encuentra en un lugar concreto del espacio (Olton, 1977; O’Keefe, Burgess, Donnet, Jeffery y Maguire, 1998). En 1971, John O’Keefe y Jonathan Dostrovsky descubrieron que estas neuronas del hipocampo se activan específicamente

cuando el animal está en una localización determinada de un ambiente. Por ello, se les llamó células de lugar; anatómicamente, estas neuronas son células piramidales de las regiones CA1 y CA3 del hipocampo. Se ha propuesto que las "células de lugar" forman parte de un mapa cognitivo en el hipocampo y se les ha considerado como elementos de una representación cartesiana del ambiente (Nadel y Eichenbaum, 1999).

II.2.3. El hipocampo y su relación con la potenciación a largo plazo (LTP) y con la depotenciación a largo plazo (LDP)

La comunicación neuronal y su modulación afecta las funciones psicológicas superiores como el aprendizaje y la memoria. Debido a que las sinapsis puede variar y su actividad repetitiva puede conducir a una alteración de corto plazo, y a modificaciones que pueden durar horas, días, e incluso volverse permanentes. Los dos fenómenos asociados a estos cambios son conocidos como potenciación a largo plazo (LTP) y depotenciación a largo plazo (LDP). La LTP es debida a un incremento en la concentración de calcio en ambas células, la pre y la posináptica, en esta última el incremento en la concentración de Ca^{2+} conlleva una modificación en el sistema de segundos mensajeros lo cual genera receptores adicionales en la membrana dendrítica con el consecuente incremento de sensibilidad al neurotransmisor que cruza la hendidura sináptica. Tanto la LTP como la LDP han sido postulados como los substratos del aprendizaje y la memoria. En el animal joven, la actividad repetitiva en el SNC puede producir cambios en la eficacia sináptica mucho más prolongados que aquellos que se ven en el animal senil. Los cuales muestran una disminución de la inducción y el mantenimiento de la LTP y de los umbrales para la LDP (Rosenzweig y Barnes, 2003).

II.2.3.1. Memoria espacial y LTP

El hipocampo regula la respuesta del animal cuando se somete a las pruebas conductuales de localización del espacio o bien a pruebas de habituación en un campo abierto. En este contexto, se ubican dos hipótesis una de la memoria referida al trabajo o espacial (Ross, Orr, Holland y Berger, 1984) y otra de la

asociación configural (Eichenbaum, Fagan, Mathews y Cohen, 1988). En la primera es el hipocampo el sitio en donde se integra esta memoria (Moser y Moser, 1998) ya que muestra cambios plásticos sinápticos después de que el animal se le ha sometido a esta experiencia de aprendizaje (Rusakov et al., 1997) y en donde se requiere de la integridad funcional del hipocampo. Los investigadores Moser, Trommald y Andersen (1994) encontraron aumento de la densidad de las espinas dendríticas en CA1 en animales que fueron sometidos a pruebas espaciales, lo que sugiere un incremento en la densidad de las sinapsis por neurona. Sin embargo, en el estudio de correlación entre el aprendizaje espacial y la ultraestructura sináptica se encontró que el CA1 del hipocampo puede mostrar cambios topográficos de circuitos locales sin que se formen nuevas sinapsis (Rusakov et al., 1997). Por el contrario, en un estudio de la reestructuración de sinapsis asociada con la fase de mantenimiento de la LTP en la sinapsis del CA1 del hipocampo y del giro dentado mostraron incremento de contactos sinápticos (Geinesman, deToledo-Morrell, Morrell, Persina y Beatty, 1996).

II.2.3.2. Memoria, glutamato y los receptores del *N-metil-D-aspartato* (NMDA).

El glutamato y los receptores del NMDA están involucrados en numerosas funciones del SNC; entre los procesos más estudiados están los que participan en la plasticidad sináptica, el desarrollo neuronal, la percepción sensorial, así como en los procesos de aprendizaje y memoria y en procesos patológicos. La maduración de los circuitos neuronales (establecimiento de conexiones funcionales) durante el desarrollo y también en el estado adulto, dependen de la activación y consolidación de ciertas sinapsis, mediante mecanismos de plasticidad en el que están involucrados los receptores NMDA, como la LTP, que produce incremento de la eficiencia sináptica a largo plazo y es un modelo experimental importante de los cambios celulares que subyacen a este incremento en la fuerza de conexión sináptica. La LTP de las sinapsis entre las neuronas piramidales del hipocampo se produce por la despolarización de una célula postsináptica con la activación repetida de una célula presináptica; esta despolarización simultánea activa a los receptores del NMDA que permiten la

entrada del Ca^{2+} a la célula y activa las cascadas responsables para el incremento de la eficacia sináptica (Debanne, Gähwiler y Thompson, 1999). Aunque la expresión a largo plazo del fenómeno de LTP requiere de la síntesis de proteínas, donde las señales transitorias pueden estar ligadas a la activación de enzimas como el CREB¹ que determinarán el crecimiento y remodelación de sinapsis potencialmente activas (Muller, Toni y Buchs, 2000; Rampon y Tsien, 2000).

II.2.4. Plasticidad neuronal (neurogénesis) y sináptica (axogénesis y espinogénesis).

Los eventos plásticos del SNC en general y de la FH en particular, se relacionan con el establecimiento de nuevas sinapsis (sinaptogénesis) o por el crecimiento de ramas (dendrogénesis), axones (axogénesis) y espinas (espinogénesis) dendríticas. Se acepta que los cambios en la organización y función de las sinapsis son el substrato fundamental para la expresión de funciones cognitivas y de aprendizaje (Bailey y Kandel, 1993). Esto confirma que el SNC es más plástico de lo que se pensaba, de hecho la remodelación de los contactos sinápticos y las dendritas de las neuronas del hipotálamo se presenta durante la lactancia. De manera similar el crecimiento de las ramas de las dendritas de la corteza cerebral va asociada a la exposición repetida en medios enriquecidos en estímulos sensoriales o bien después de someterse a pruebas de entrenamiento. Algunos estudios experimentales demostraron que ratas que realizaron una tarea acrobática presentaron sinaptogénesis (formación de nuevas sinapsis) en la corteza motora (Kleim, Lussnig, Schwarz, Comery y Greenough, 1996). Hoy, uno de los cambios estructurales más asociados al aprendizaje y la memoria es la sinaptogénesis. Este tipo de cambio anatomo-funcional ha sido descrito en el hipocampo como un incremento en los contactos sinápticos de las fibras musgosas (FM), de las células granulares del giro dentado con las espinas dendríticas del estrato *lucidum* de las neuronas piramidales del CA3 después de un aprendizaje espacial aunque en una condición de sobreentrenamiento parecen llegar al estrato *oriens* (Ramírez-Amaya et al., 2001).

¹ Proteína de transcripción, o elemento de respuesta al pegado del AMP cíclico secuencia llamada cAMP por sus siglas en inglés cycle response elements binding, CREB.

II.2.5. Cambios celulares del hipocampo por estrés, hipoestrogenismo y envejecimiento

Por otra parte, el estrés, el hipoestrogenismo y el envejecimiento son factores que tienen efectos diferenciales sobre las pruebas de memoria dependientes del hipocampo. Como ya se mencionó, el hipocampo de los humanos, regula la memoria episódica, declarativa contextual y en los animales la memoria de aprendizaje de tipo espacial, tanto como en la regulación de las funciones vegetativas como la secreción de la hormona adrenocorticotrófica (ACTH), en donde el hipocampo muestra amplia atrofia. Las neuronas del hipocampo expresan receptores a esteroides adrenales circulantes (McEwen, Weiss y Schwartz 1968), de dos tipos I y II, mineralocorticoides y glucocorticoides, respectivamente, los cuales median un número importante de excitabilidad neuronal, neuroquímica y plasticidad estructural (DeKloet, Vreugdenhil, Oitzl y Joels, 1998).

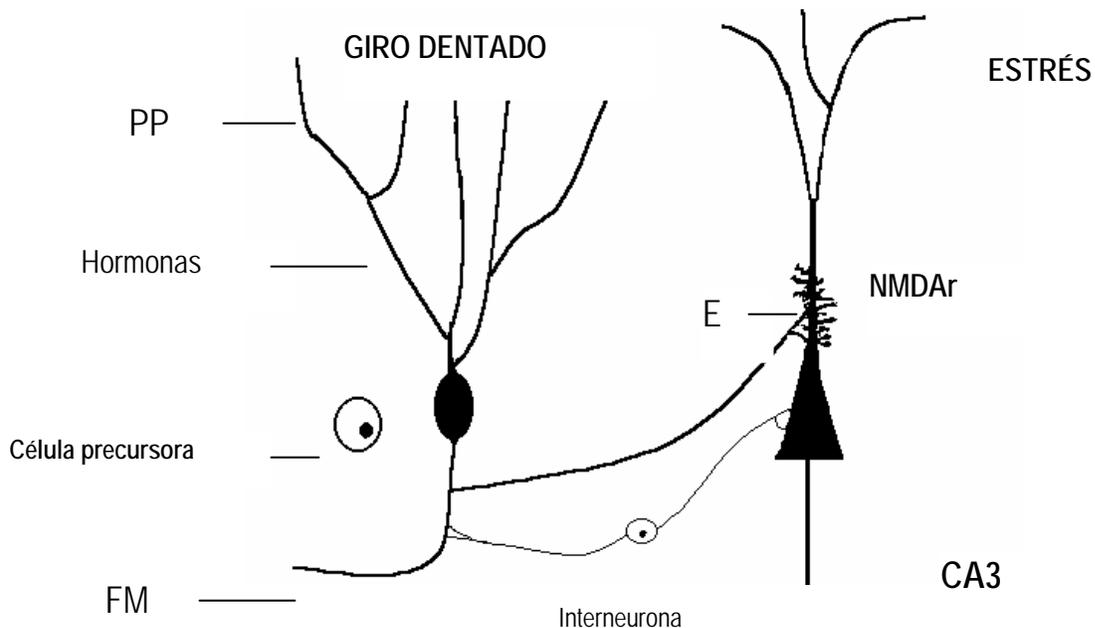


Figura 6. Regulación hormonal y por neurotransmisores de la plasticidad del hipocampo adulto. Además de los estrógenos y la serotonina el estrés y la apoptosis en el giro dentado estimulan la neurogénesis. La entrada excitatoria al CA3 es por vía de los receptores NMDA en concierto con esteroides adrenales, ambos responden al estrés crónico que puede inhibir la neurogénesis. Las fibras musgosas de las células granulares son excitatorias (glutamatérgicas) y llegan a las excrescencias (E) de la dendrita piramidal del CA3, que mantienen su tono entre excitabilidad e inhibición por las interneuronas GABAérgicas del hilus.

La estructura hipocámpica es sensible a hormonas gonadales y expresan ambos receptores intracelulares andrógenicos y estrogénicos (Woolley 2007). Ambas hormonas adrenales y gonadales, participan en los cambios estructurales durante la vida, tanto en los eventos del desarrollo, que incluyen la diferenciación sexual como en las influencias tempranas a las experiencias estresantes de la vida. Los efectos de estas hormonas no ocurren aislados, sino dentro del contexto de la actividad neuronal. Así, los aminoácidos excitatorios (AAE) y receptores como el N- metil-D-aspartato (NMDA), así como la serotonina (5-HT), juegan un papel importante en los cambios estructurales dentro de la formación hipocámpica por hormonas esteroides (McEwen, 2001; Woolley, 2007). La importancia clínica de estos receptores es fundamental porque son vulnerables durante la muerte neuronal de las células piramidales, cuando se someten a estimulación e isquemia así como por el estrés psicosocial severo y prolongado el que reduce las vesículas sinápticas de las fibras musgosas sobre el CA3 y en turno, provocan atrofia de la neuronas piramidales del CA3 (Magarinos y McEwen 1995), (Figura 6). El bloqueo de los receptores NMDA es efectivo para prevenir la atrofia dendrítica inducida por el estrés (McEwen, 2001). La exposición con glucocorticoides, produce incremento en la producción de sitios de unión de receptores NMDA a nivel de las sub unidades del RNAm (NR2A y NR2B), seguido de una acción sobre la expresión del RNAm para sub unidades específicas a los receptores del ácido gamma-aminobutírico (GABA) en CA3 y en el giro dentado. Ambos niveles bajos y altos de sitios de unión de sub unidades de RNAm, sugireren que la corticosterona puede alterar la excitabilidad del hipocampo a través de la regulación de los receptores GABA_A.

Los estrógenos inducen la formación de nuevas sinapsis en el CA1, dependiendo de la cantidad de los receptores a NMDA. Si las sinapsis de las espinas son excitatorias y se encuentran en ellas los receptores NMDA, entonces tiene sentido que los efectos a largo plazo de los estrógenos induzcan la formación de mayores sitios de unión de los receptores NMDA en el CA1 del hipocampo (Woolley, 2007). Por otra parte, el envejecimiento produce alteraciones celulares que son más pronunciadas en células postmitóticas como las neuronas y que repercuten en las funciones esenciales del cerebro como es la pérdida de la memoria. Se sabe que

la plasticidad neuronal del hipocampo es vulnerable al envejecimiento, al estrés y a la isquemia que producen daño y pérdida neuronal en las células de proyección (piramidales y las de lugar) del campo CA1, y en las sinapsis de las células del giro dentado (Knierim y McNaughton, 2001). Estos cambios se han relacionado con deficiencias en el aprendizaje de la memoria espacial en animales seniles. Por lo tanto se deberán implementar más estudios de correlación entre los cambios anatómicos producidos por el envejecimiento en las neuronas que regulan la integración de funciones cognitivas, un ejemplo es la función del circuito hipocámpico durante el aprendizaje espacial y el papel de estos parámetros que cambian con la edad. Existe inconsistencia en la literatura entre las medidas conductuales y las pruebas motoras y de memoria en animales seniles, por ello se han propuesto dos variables, entre ellas excluyentes; una que requiere de las mediciones de las respuestas motoras y otra son los índices de conciencia en donde se incluyen distintas medidas de pruebas espaciales. Así, se puede esperar que los cambios neurobiológicos sean heterogéneos en el proceso senil, y consecuentemente los cambios cerebrales debidos a la edad que coinciden con la deficiencia de la memoria espacial.

II.2.5.1 Navegación espacial

Casi todos los animales disponen de un sistema de orientación espacial que les permite organizar conductas de alimentación y reproductivas entre otras, para ello es necesario el desarrollo y uso de estrategias que les permitan navegar en el espacio, aprender y recordar la localización de lugares. La navegación espacial es una conducta compleja que se caracteriza por el desarrollo de movimientos autocontrolados en el espacio y son dirigidos a localizar un lugar no visible para los sujetos (Alyan, Jander y Best, 2000). Existen varias formas de navegar por el espacio y posiblemente también existen varios procesos neurobiológicos involucrados. La primera clasificación de navegación espacial hecha por O'Keefe y Nadel (1978) proponía un sistema táxico y uno cartográfico, el táxico incluye el aprendizaje de series de movimientos corporales para arribar a un lugar o la aproximación directa hacia estímulos asociados con el lugar meta. El cartográfico, por otro lado, implica un aprendizaje por asociación, en el cual es

necesaria la localización de un lugar respecto a la configuración de pistas disponibles en el ambiente y es el sistema que interesa en este estudio. Aunque han sido descritos otros procesos en los que el hipocampo también tiene una participación esencial (Martínez, Quirarte, Díaz-Cintra, Quiroz y Prado-Alcalá, 2002), todos tienen en común un aspecto: para ubicarse y llegar a un sitio conocido el sujeto, deberá recordar de alguna manera dónde se encuentra el lugar. Probablemente la manera de recordar sea muy diferente dependiendo de cada forma de navegación, pero en general, las memorias se construyen con los mismos procesos generales: codificación, almacenamiento y recuperación.

II.2.6 Hipocampo y sistema de fibras musgosas (FM)²

La plasticidad del SNC es la respuesta neuronal a reorganizar sus conexiones y formar nuevas sinapsis, (sprouting), en donde una simple fibra o axón puede generar una colateral adicional, o extensiones, botones y prolongaciones en red, asociados a moléculas de adhesión, células gliales y factores neurotróficos (Amaral y Witter, 1995). Después de un trauma, las neuronas que sobreviven forman nuevas sinapsis y reemplazan a las que se perdieron. Esta sinaptogénesis “reactiva” se describió por primera vez en 1958 por Liu y Chambers, en la médula espinal y en 1969 Raisman la describió en el cerebro. Desde entonces numerosos estudios han confirmado esta observación y se ha profundizado en el conocimiento de los mecanismos celulares involucrados en el tejido nervioso después de un trauma. En el hipocampo *in vitro*, se estudian los mecanismos compensatorios que involucran los factores moleculares en la reorganización de los circuitos neuronales, y se identifican claramente las proyecciones topográficas del patrón perforante (PP) en el giro dentado que al denervarse es posible diferenciar entre los cambios degenerativos del PP y los cambios reactivos generados por esta denervación. Se sabe que las entradas corticales alcanzan el hipocampo a través de la corteza entorrinal. En esta área se integran los agentes subcorticales (septales y talámicos). El relevo se hace a

² Fueron descritas por Golgi en 1886 y denominadas por Cajal, en 1892 por su similitud con las fibras musgosas del cerebelo, ya que presentan largas varicosidades y extensiones de filamentos en forma de musgo.

través de las células estrelladas de la capa II entorrinal terminando más del 80% en la capa molecular del giro dentado, con excepción de las GABA_{érgicas}, las fibras son excitatorias glutamatérgicas (Nicoll y Schmitz, 2005).

II.2.7. Cambios moleculares asociados a la axogénesis y sinaptogénesis

Después de la denervación del patrón perforante, las dendritas de las células granulares sufren cambios como elevación del calcio intracelular seguido del aumento en la activación de las enzimas proteasas. Esto ocurre por dos mecanismos uno es la activación de los receptores NMDA que incrementa la entrada de calcio a la dendrita y el otro es la generación de fosfatidil inositol trifosfato (IP3) que regula el almacenamiento del calcio intracelular. En el axón se promueven las proteínas de crecimiento, formando contactos sinápticos con las dendritas, axones de otras células. La fosfo proteína GAP-43, se expresa en la membrana del cono de crecimiento durante los periodos de crecimiento axonal. Los análisis cuantitativos de esta proteína GAP-43, indican que se incrementa hasta 300%, en los 14 días después de la lesión (Wang y Shang 2001). Esta proteína parece ser sintetizada en los cuerpos neuronales de las células en axogénesis y se transporta de manera anterógrada dentro de la zona denervada. Existen además, moléculas de adhesión en el crecimiento del axón para los procesos de reorganización después de una lesión. Adicionalmente, se incrementa su inmuno reacción en la membrana de los axones que llegan a la capa molecular del giro dentado después de 65 días ocurrida la lesión, lo que indica su papel en la maduración y estabilización de la sinapsis. La molécula neuronal de adhesión (NCAM) y sus RNAm se reportan después de una lesión. Las isoformas de NCAM, se han mostrado en el crecimiento de los axones después de lesión periférica y durante la re inervación por vía de interacciones de uniones homofílicas e interacciones heterofílicas con moléculas de la superficie celular. Las proteínas relacionadas con la formación de las sinapsis se han descrito en estudios de microscopía electrónica. Así, la sinaptofisina se asocia al pegado de la vesícula sináptica en la membrana para la liberación del neurotransmisor y la sinapsina en la terminal sináptica asociada a la proteína NT75 y a la proteína sinaptosomal SNAp25 (Patanow, Day y Billingsley, 1997)

producidas en la capa molecular durante la degeneración terminal y que incrementan cuando se restablecen los niveles basales durante el tiempo de la sinaptogénesis. De manera reciente se ha mostrado el papel de la glia en la reorganización del giro dentado después de la lesión, las cuales son cruciales para el proceso de axogénesis del crecimiento axonal, para remover las terminales degeneradas y pueden influir en el crecimiento de los axones a través de la síntesis de factores neurotróficos o bien en la presentación de las moléculas de adhesión o a través de factores que dejan la estabilización de las sinapsis (Deller, Bas Orth, Vlachos, Merten, Del Turco, Dehn, Mundel y Frotscher 2007).

II.2.8. El sistema de FM

La proyección de las FM es en la zona proximal de las dendritas apicales de las células piramidales del área CA3 en el estrato *lucidum*, a las que se les denomina conexiones suprapiramidales. Sin embargo, se ha observado que tras diferentes tipos de tratamiento, conductual (Ramirez-Amaya, et al., 2001), electrofisiológico (Morimoto, Fahnestock y Racine, 2004) y bioquímico (Ben Ari y Represa, 1990), las FM establecen sinapsis en las zonas proximales de las dendritas basales de las células piramidales del área CA3 en el estrato *oriens*, a las que se les denomina conexiones infrapiramidales. Este tipo de sinapsis, ha sido detectada con la técnica histoquímica de Timm y corroborados utilizando otras técnicas como la de Golgi (Ben Ari y Represa, 1990), o trazadores de vías neurales (Franck, Pokorny, Kunkel y Schwartzkroin, 1995) o por microscopía electrónica (Amaral y Dent, 1981; Ramírez-Amaya, et al. 1999). En los roedores, el giro dentado (GD) está formado por cerca de un millón de células granulares, cuyo axón no mielinizado, mide en promedio 1 μm de diámetro, y al ramificarse forma las colaterales finas que dan origen al plexo musgoso o FM. Las terminaciones de las FM, llegan al segmento proximal de la dendrita apical de las células piramidales del campo CA3 y hacen sinapsis en la zona de excrecencias torneadas en aproximadamente 100 μm de esta área la que se identifica como el estrato *lucidum*. Una FM, establece contactos con 12 células piramidales del CA3 y en cada una hace 37 sinapsis, aunque una sola célula piramidal recibe entradas de hasta 50 células granulares. Las dendritas basales también reciben entradas

de las FM en la zona infra piramidal o estrato *oriens*, que representa el sustrato anatómico para la plasticidad sináptica, capaz de responder variando su extensión por los diferentes cambios del medio ambiente según la especie y la variedad de los roedores, incluso entre variedades de ratas como la Fisher y la Wistar (Holahan, Honegger y Ruttenberg, 2007). Su tamaño puede incrementarse cuando los animales han sido sometidos a diferentes pruebas experimentales como el sobreentrenamiento en el laberinto de agua, o por estimulación eléctrica tipo kindling (Cavazos, Golaria y Sutula, 1991) por la vía amigdalina (Represa, Le Gall La Salle y Ben-Ari, 1989); produciendo el estatus epilepticus (Niquet, Jorquera, Faissner, Ben-Ari y Represa, 1995) o por estimulación de alta frecuencia como la potenciación de largo plazo (Escobar, Barea-Rodríguez, Derrick, Reyes y Martínez, 1997; Adams, Lee-M, Fahnestock y Racine 1997).

II.2.8.1. Anatomía de las FM

Una característica de las células granulares del GD es que continúan generándose a lo largo de la vida del sujeto a partir de células troncales localizadas en el hilus y las nuevas células granulares migran hasta la capa granular. Sin embargo, el número de células no se incrementa con la edad, porque está regulado de manera dinámica por las influencias del medio ambiente. Así, la exposición del animal hacia ambientes nuevos (Kempermann, Jun y Cage, 1997) hace que se incremente la proliferación. Si se asume que las células granulares recientes forman nuevas FM (axogénesis) que hacen sinapsis con las pirámides del CA3 luego, este patrón sufre remodelación continua. Parece, sin embargo, que no todas las FM son capaces de producir axogénesis sino solo aquellas de generación reciente (Parent, Tada, Fike y Lowenstein 1999). Las FM hipocámpales que se originan en las células granulares y hacen sinapsis con las piramidales del CA3, han sido fuente de numerosos estudios debido quizás a que es un modelo de sinapsis en donde se analizan las propiedades básicas de la transmisión sináptica del SNC. Se sabe que este tipo de sinapsis es única en todo el SNC porque presenta propiedades que modulan de manera diferente a las células del hilus y del CA3. Las FM en el hipocampo de la rata, se generan de cerca de 1 millón de células granulares del GD, Simic, Kostovic, Winbland y

Bogdanovic (1997), calculan 15 millones en el hipocampo humano. Estas células proveen de la entrada sináptica a las neuronas del hilus y a las piramidales del CA3 y sus FM, representan la segunda sinapsis del intracircuito hipocámpico, llegando a la zona proximal de las dendritas apicales de estas células. En los roedores las FM dejan el hilus y en el CA3 forman la banda del estrato *lucidum*. La magnitud de la proyección, longitudinal varía en función de la localización septo-temporal de las células granulares madre que se colocan septalmente y cuya proyección mayor es longitudinal. El promedio de la longitud de los axones de las FM de las células granulares en el plano dorsal es de $3,250 \mu\text{m} \pm 72 \mu\text{m}$.

Las células piramidales del CA3, también reciben en sus dendritas basales las FM (borde infrapiramidal), que cruzan a través de la capa de células piramidales y entran al estrato *lucidum* en las divisiones c y b del CA3, según descripción de Lorente de Nó, (1934). La extensión de esta proyección infra piramidal, varía de especie a especie, como se ha mostrado en la epilepsia inducida con la técnica de kindling en la amígdala (Represa et al., 1989). Una observación importante es aquella que se refiere a la correlación entre la magnitud de la proyección de las FM en la porción basilar de las células piramidales del CA3 (estrato *oriens*), cuando el animal se ha sometido a pruebas de laberinto espacial. En el hombre Lim, Blume, Madsen y Saper en 1997, describieron una proyección de las FM intra e infra piramidal a través de todo el CA3.

II.3. SINAPSIS DE LAS FM CON CÉLULAS EXCITATORIAS E INHIBITORIAS DEL HILUS Y DEL CA3

Las terminales axónicas de las FM están formadas por botones sinápticos gigantes ($4-10 \mu\text{m}$ de diámetro y con un volumen aproximado de $50 \mu\text{m}^3$) con múltiples dobleces y varicosidades. Estos botones se encuentran invaginados por excrescencias y espinas de las células piramidales del CA3, a los que envuelven completamente, formando grandes complejos sinápticos (Henze, Urban y Barrionuevo 2000) (Figura 7), de 11 a 18 sinapsis (Clairborne, Xiang y Brown, 1993). Además, en el hilus del hipocampo, cada axón de las FM hace múltiples sinapsis con las células musgosas excitatorias (10 sinapsis) y con los distintos tipos de interneuronas (140 a 150 sinapsis), siendo de 40 a 50 contactos con las

interneuronas que tienen dendritas en el estrato *lucidum* (40 a 50 sinapsis), las cuales tienen espinas y son positivas a caldretina y a glutamato. Esta posibilidad hace que muchas células no piramidales hipocámpales pueden ser inhibitorias GABA_{érgicas} aunque hay neuronas locales excitatorias como las células musgosas. Los investigadores Vida y Frotscher en el 2000, reportaron otro subtipo de célula inhibitoria GABA_{érgica} que inerva a las células piramidales del CA3 y su posición produce una retroalimentación inhibitoria seguida de la actividad de las FM.

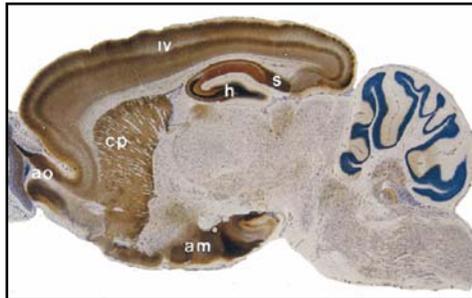


Figura 7. Corte parasagital de cerebro de rata tratado con la técnica de Timm, en el SNC y muestra la importante concentración de éste en el hipocampo (h) y el subículo (s). Se observa el caudado y putamen (cp), el área olfativa (ao), la amígdala (am) y la capa IV de la neocorteza (modificado de Federickson y Moncrieff, 1994).

II.3.1. Patrón sináptico y morfología de las FM

Los axones de las FM forman contactos sinápticos en el hilus y en el CA3 con botones grandes presinápticos (4-10 μm de diámetro) que contienen miles de pequeñas vesículas claras (40-60 nm) y muchas vesículas de campo denso grandes. Cada botón de las FM contiene retículo endoplásmico liso y aproximadamente 8 mitocondrias y una estructura laminar, cuya función se desconoce. El cuerpo principal del botón pre sináptico de la FM envuelve una espina con múltiples cabezas, denominada excrescencia torneada que sobresale de la dendrita proximal de las células musgosas hilares y de las piramidales del CA3 (Figura 8).

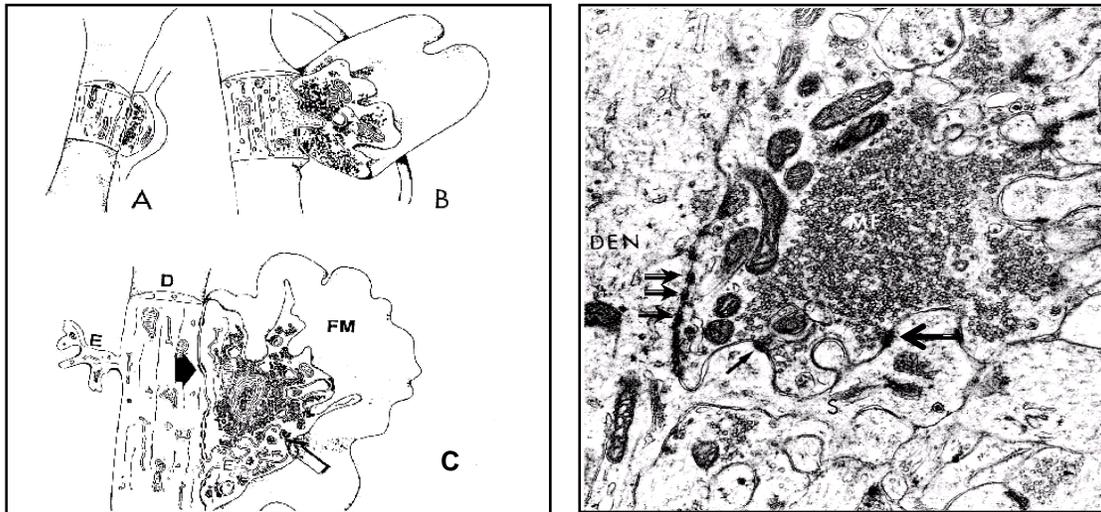


Figura 8. A la izquierda, el esquema de los tres estadios de maduración de las fibras musgosas (FM) y las excresencias torneadas (E) de la dendrita (D) de las células piramidales del CA3. En A, el primer estadio en donde las FM, hacen contactos simétricos y asimétricos con la D seguido de un crecimiento pronunciado y la acumulación de las vesículas en la terminal. En B se inicia el crecimiento de los "dedos dendríticos" o espinas especializadas que penetran en la terminal axónica, se empiezan a definir solo sinapsis asimétricas. En C, un estadio final en donde hay aumento de: el aparato espinal, retículo endoplásmico liso y mitocondrias y las sinapsis asimétricas (flecha) se establecen en las E, mientras que las simétricas (cabeza de flecha) se mantienen solo en la D (*modificado de Henze, et al., 2000*). A la derecha, una micrografía electrónica del complejo sináptico de las FM. La dendrita de la célula piramidal postsináptica del área CA3 (DEN), es envuelta por la terminal presináptica de una FM. La terminal presináptica contiene numerosas vesículas y algunas mitocondrias. La excrescencia de la terminal postsináptica (S) es penetrada por el botón de las FM. Las flecha y las flechas, indican las uniones simétricas y asimétricas, respectivamente (*modificado de Amaral y Dent., 1981*).

Varios botones de FM se anclan alrededor de la excrescencia de la dendrita de la célula piramidal del CA3 por una serie de engrosamientos simétricos denominados *puncta adherentia* o botones gigantes asociados formando el complejo sináptico de las FM y se identifican a partir del día 21 posnatal en la rata. Esta asociación se desarrolla a la llegada de los axones de las FM (Robain, Barbin, Billette de Villemeur, Jardin, Jahchan y Ben-Ari. 1994). Uno de los aspectos más interesantes del complejo FM es la presencia de múltiples zonas activas y de asociación posinápticas. El número mayor reportado en las células piramidales del CA3 por FM es de 35, el promedio se asume de 14 zonas activas por complejo. Así, cada célula piramidal del CA3 posee alrededor de 700 zonas activas asociadas con el patrón de excitación de las FM en solo alrededor de los 100 micrometros proximales de la dendrita apical. En la posinapsis, durante el desarrollo, se identifican los filopodia precursores de las espinas dendríticas o de

las excrescencias torneadas, cuyo tamaño varía con la edad (tamaño máximo de 30 μm en la rata de dos semanas de edad) y sufren retracción en los animales adultos de 4 semanas (12 μm).

Así, en el modelo clásico de la intra circuitería del hipocampo se reconoce a todos los axones de las células granulares como las FM que establecen sinapsis (intrahipocámpica), excitadoras glutamatérgicas, con las excrescencias torneadas apicales de las neuronas del campo CA3, que reciben otras entradas mono sinápticas de la corteza entorrinal provenientes de la amígdala por vía del patrón perforante (PP), entrada de tipo extra hipocampal (que forma un circuito doble). Esto sugiere, que la modulación del CA3 se debe a la interacción de ambas entradas (Henze et al. 2000). El conocimiento de estas conexiones básicas ayuda a entender la contribución de las FM a la función del CA3 de hecho este tipo de sinapsis entre la FM-CA3 provee de la conexión más especializada del circuito intrasinpático del hipocampo de alta eficiencia y que actúa como un detonador condicionado capaz de evocar potenciales de acción en las células piramidales del CA3 si este es activado de manera repetida (Kerr y Jonas, 2008). Además, se sabe que las FM tienen alto contenido de zinc, que participa en el proceso de señalización celular y que se libera durante transmisión sináptica³. El zinc de las FM, se localiza en vesículas de centro denso y es retomado en la liberación de las FM. La tinción de Timm, que revela al zinc, puede ser usada para el estudio de la inervación de las FM (Figura 9). Aunque la función del zinc no ha sido completamente dilucidada, se sabe que bloquea los canales de NMDA y reduce la respuesta GABAérgica y la corriente al calcio probablemente por la liberación intracelular del mismo. Trabajos de Frotscher, Jonas y Sloviter (2006), indican una mayor complejidad funcional de las FM con las interneuronas GABAérgicas tanto del hilus como del CA3 que modulan el circuito inhibitorio del hipocampo. Por

³ El zinc también es un elemento importante, de hecho el segundo más abundante (500-250 pm) en el SNC, después del hierro. Es especialmente abundante en la amígdala, corteza e hipocampo, en este último las neuronas granulares son ricas en zinc y su transmisión sináptica depende de los botones del zinc en las FM (Pfeiffer y Braverman, 1982). El zinc detectable con técnicas como Timm, es accesible a la extracción con quelantes y es zinc iónico por tanto. Éste entra a compartimientos membranosos: es zinc vesicular en neuronas ricas en zinc que durante su actividad lo vierten a la hendidura sináptica, es 'zinc sináptico'. El zinc sináptico cumple funciones de modulación de actividad de receptores para el glutamato, GABA, acetilcolina, ATP, etc. (López-García, Molowny, Ponsoda, Nacher y Sancho-Bielsa, 2001) La deficiencia severa de zinc en ratas adultas produce efectos similares por lesión en el hipocampo.

consiguiente las células granulares también pueden producir inhibición de manera indirecta, por la vía de activación de las interneuronas o de manera directa por la vía de la liberación del GABA, en condiciones patológicas como la epilepsia (Nicoll y Schmitz, 2005); por lesiones con kaínico (Shetty y Turner, 1999) o durante el desarrollo del hipocampo.

II.3.2. Papel funcional de las FM

Esta sinapsis entre la FM-CA3, con múltiples botones invaginados de más de 10 μm de diámetro, establecen contactos con espinas dendríticas gigantes (Figura 8), cuyos componentes subcelulares y su morfología son únicas en el SNC así como la forma de sus ramificaciones dendríticas. Las células granulares constituyen la puerta de entrada del patrón perforante al hipocampo, por lo que su papel es de un pivote en la transmisión excitatoria de las neuronas piramidales del CA3 (Kerr y Jonas, 2008). Así, cuando en la célula granular se inicia un potencial de acción el axón de las FM estimula aproximadamente a 14 células piramidales del CA3. Además, por su ubicación proximal a la dendrita, muestra facilitación alta a la frecuencia de los potenciales excitatorios y mientras las células granulares excitan a un grupo limitado de células de la región del hilus, despolarizan a las células piramidales del CA3 y a las interneuronas del estrato *lucidum*. Esta hipótesis del detonador asume que las células piramidales del CA3 tienen fijo su umbral y para iniciar el potencial de acción las FM deberán ser capaces de exceder este umbral. Sin embargo, el potencial de acción de la célula piramidal es un evento complejo ya que resulta de la interacción de múltiples factores y solo existe en condiciones sub umbrales. Las FM glutamatérgicas generan los potenciales excitadores postsinápticos que actúan sobre los subtipos de receptores de quisqualato y kainato de las neuronas piramidales del CA3, que reciben además de las FM, entradas de una proyección intrínseca de las fibras comisurales contra laterales y de otras aferentes subcorticales. Las proyecciones de las CA3 (recurrentes de Shaffer) interconectan de manera poderosa con una recurrente excitatoria sobre las dendritas. Esta recurrencia es glutamatérgica e involucra a los receptores NMDA y tiene especial sensibilidad a las neuronas CA3 en condiciones epileptogénicas.

II.3.3. Axogénesis de las FM

Mucho del conocimiento de los mecanismos celulares de la memoria y del aprendizaje deriva de los estudios sobre la LTP del hipocampo, de la transmisión sináptica producida por un tren de estimulación eléctrica de alta frecuencia o por los bloqueadores de los canales de potasio. El hipocampo es una región propensa a tener episodios de descargas y se ha descrito que estos episodios breves producen un efecto importante en los cambios a largo plazo o LTP. Un episodio breve es capaz de producir una cascada de eventos que incluye la expresión de los genes inmediatos, la axogénesis de las FM y el establecimiento de nuevos contactos sinápticos (Figura 9). El mecanismo que induce la axogénesis de las FM, se debe a una cascada causada por diversos eventos; uno de los cuales, es dependiente de calcio para el proceso de la LTP que desencadena la entrada de calcio a las neuronas hipocámpicas, otro sugiere que la axogénesis de las FM es un sustrato anatómico funcional que favorece el aprendizaje y la consolidación de la tarea espacial en animales jóvenes.

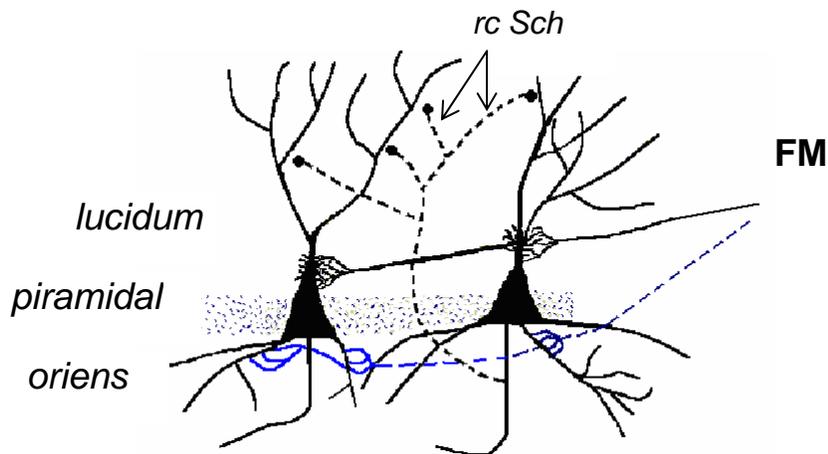


Figura 9. Entrada de las fibras musgosas (FM), hacia los estratos *lucidum* y *oriens*. Se muestran también las fibras recurrentes de Schaffer (*rc Sch*) y la capa de células piramidales (modificado de Ben-Ari y Represa, 1990).

II.4. Patrón de estabilidad sináptica entre la FM y el CA3 en el hipocampo senil

En el 2001, Poe, Linville, Riddle, Sonntag y Brunso-Bechtold, reportaron que las células granulares del giro dentado y las piramidales del CA3 del hipocampo de animales jóvenes de 4 meses, preseniles de 18 y seniles de 29 meses, mantienen sus características plásticas anatómico-funcionales, a diferencia de otras áreas del propio hipocampo como son las neuronas piramidales del CA1 y de la neocorteza. Adicionalmente, se ha comprobado que las influencias del medio ambiente, también produce neurogénesis, incluso la sinaptogénesis se mantiene debido a la diferenciación de la extensión axonal de las células granulares preexistentes, lo que resulta en la estabilidad sináptica de la sinapsis entre la FM y el CA3 hasta el envejecimiento (Poe et al, 2001).

Las neuronas piramidales del SNC han sido objeto de numerosos estudios en donde se relaciona el grado de afectación neuronal y la calidad sináptica por el envejecimiento. Así, Forbes, Bennett, Lynch, Sonntag, Riddle, (2001), reportaron tanto en neuronas como en la glia, la acumulación de lipofusina en el CA3 del hipocampo en grupos de ratas entre 25-28 meses de edad, con disminución del 25% de la densidad de neuronas y un aumento de la glía. Estos estudios indican la alta susceptibilidad del hipocampo no solo al envejecimiento sino también a la desconexión de las neuronas de proyección que ocurre por el mismo proceso o por algún factor de riesgo. Aunque la axogénesis de las FM se conserva en un 50% en edades pre-seniles y seniles comparado con animales jóvenes (Shetty y Turner, 1999).

Lo que permanece por ser aclarado es si la plasticidad de las FM en animales adultos maduros pero sobreentrenados en el laberinto acuático de Morris, puedan desarrollar axogénesis de las FM de las células granulares del giro dentado no solo sobre el primer tercio de la dendrita apical que corresponde al estrato *lucidum*, sino además en las dendritas basales del estrato *oriens* de las células piramidales del CA3 del hipocampo como ha sido reportado (Ramírez-Amaya et al., 1999).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Con base en los antecedentes mencionados, se pondrá a prueba la capacidad plástica del hipocampo mediante el estudio de relación anatomo-conductual que permiten entender la respuesta sináptica en particular de las FM y su capacidad de axogénesis en los estratos *lucidum* y *oriens* del CA3 de animales machos adultos maduros (230 días de edad) sobreentrenados en el LAM. Las comparaciones anatómicas de los grupos experimentales y entre ambos estratos (*lucidum* y *oriens*), permitirán establecer la relación entre la respuesta sináptica con el tipo de entrenamiento de cada grupo. Las observaciones anatómicas en esta área confirmarán si hay una relación funcional en la integración de esta conducta de memoria espacial. Además, el estudio así planteado permitirá confirmar si los animales adultos maduros conservan esta capacidad plástica del hipocampo.

IV. PARTE EXPERIMENTAL

IV.1. HIPÓTESIS

Las ratas macho adultos maduros, presentarán cambios plásticos (axogénesis) de las FM (o brotes axonales), a nivel de la sinapsis FM-CA3 en los estratos *lucidum* y *oriens* del hipocampo al ser sometidos a la prueba de entrenamiento y sobreentrenamiento en el laberinto acuático de Morris.

IV.2. OBJETIVO GENERAL

Evaluar en animales machos adultos maduros de 230 días de edad, de la cepa Sprague Dawley probados en el laberinto de agua con o sin sobreentrenamiento, la respuesta sináptica de las FM que llegan a los estratos *lucidum* y *oriens* del CA3.

IV.2.1. Objetivos particulares

- Implementar las pruebas de entrenamiento y sobreentrenamiento.
- Caracterizar el área y distribución de las FM del hipocampo de los estratos *lucidum* y *oriens*.

- Comparar el área ocupada por las FM del hipocampo en los estratos *lucidum* y *oriens* de ratas entrenadas y sobreentrenadas, con el grupo control.

V. MATERIAL Y METODOS

El protocolo experimental utilizado en el presente estudio fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México y está acorde con la guía internacional para el uso y manejo de animales de experimentación (NIH y la National Academy of Sciences, 2003).

V.1. Sujetos

Se utilizaron ratas macho adultos maduros Sprague-Dawley de 230 días de edad que fueron obtenidas de ratas primiparas destetadas a los 21 días y alojadas dos animales del mismo sexo en cajas de acrílico (24 x 21 x 45 cm), para su habitación y con libre acceso al alimento (Purina Chow estandar fórmula 5001) y agua. Todos los sujetos, se mantuvieron en el bioterio general del INB, en un cuarto con temperatura controlada ($25 \pm 2^\circ\text{C}$); con humedad del 50% y ciclos de luz-oscuridad de 12:12 hr iniciando el periodo de luz a las 7:00 hr. Para el experimento conductual, los animales se separaron en cajas individuales para su habituación y se pasaron 7 días antes del experimento al bioterio del laboratorio de conducta. Al final del experimento se regresaron al bioterio del INB y 10 días después se procedió a su sacrificio para la preparación histológica del hipocampo dorsal.

V.2. Grupos de estudio conductual

Se formaron cuatro grupos experimentales cada uno con 10 animales:

- a. Control intacto (CI), mantenido como control
- b. Control para nado (CN), nadando en el LAM, sin plataforma, sin pistas espaciales, por 1 min, 3 veces por día, por 3 días (3 minutos nadando en el tanque excede el tiempo de nado de los animales entrenados en cada sesión diaria).
- c. Entrenado durante dos días en el LAM (LAM2) y
- d. Sobre entrenado durante cuatro días en el LAM (LAM4).

V.3. Entrenamiento de tipo espacial

Para el entrenamiento espacial se utilizó el LAM (Figura 11) consistente de un tanque circular negro de plástico con diámetro de 150 cm y una altura de 60 cm colocado sobre una base de metal que lo sostiene a una altura de 58 cm del piso. Se llenó con agua hasta una altura de 30 cm manteniéndose una temperatura tibia de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ que evita un estrés adicional (Kogan y Richert-Levine, 2008). Las cuatro posiciones de inicio se marcaron en la cara externa del tanque con los cuatro ejes cardinales Norte (N), Sur (S), Este (E) y Oeste (O), dividiéndose por tanto en 4 cuadrantes. Se colocó una plataforma de plástico transparente con dimensiones de 10 x 10 cm, sumergida 1 cm. bajo la superficie del agua. El cuarto sonoamortiguado donde se ubicaba el tanque tuvo una dimensión de 236 cm x 225 cm x 242 cm y en sus paredes blancas se colocaron carteles como señales.

V.3.1. Entrenamiento

Se utilizó el paradigma de laberinto acuático de plataforma oculta para medir la memoria de tipo espacial. Todas las ratas recibieron 10 ensayos por día y en cada ensayo la rata fue colocada dentro del tanque mirando de frente a la pared en uno de los puntos designados aleatoriamente para el inicio (N, S, E, O); la rata podía escapar del estímulo aversivo (agua) encontrando y subiéndose a la plataforma de escape. Se utilizaron diferentes puntos de inicio en cada ensayo y cada uno de estos puntos fue utilizado de 2 a 3 veces dentro de los ensayos. La plataforma de escape se encontraba en el cuadrante izquierdo en todos los ensayos y el primero, el octavo y el décimo puntos de salida fueron al O; en el segundo y quinto puntos de salida se colocó al N, en el tercero y séptimo puntos al S y el cuarto y noveno puntos al E del tanque (Figura 10). Si la rata no escapaba durante el primer ensayo, a los 60 seg era guiada por la mano del experimentador hacia la plataforma de escape. En los ensayos subsecuentes se retiraba del laberinto al llegar a la plataforma o al cumplir 60 seg nadando sin importar el lugar en donde se encontraba. Cuando la rata se subía a la plataforma se le permitía permanecer ahí durante 20 segundos y después era retirada del laberinto, cada

rata era secada con una toalla de algodón y colocada en una caja de descanso individual por un intervalo de 30 seg para posteriormente iniciar el ensayo siguiente (Ramírez-Amaya et al, 1999), (el agua se limpió de bolos en cada ensayo). Se midió la latencia de llegada a la plataforma de escape y fue usada como una medida de adquisición (Ramírez-Amaya et al, 1999).

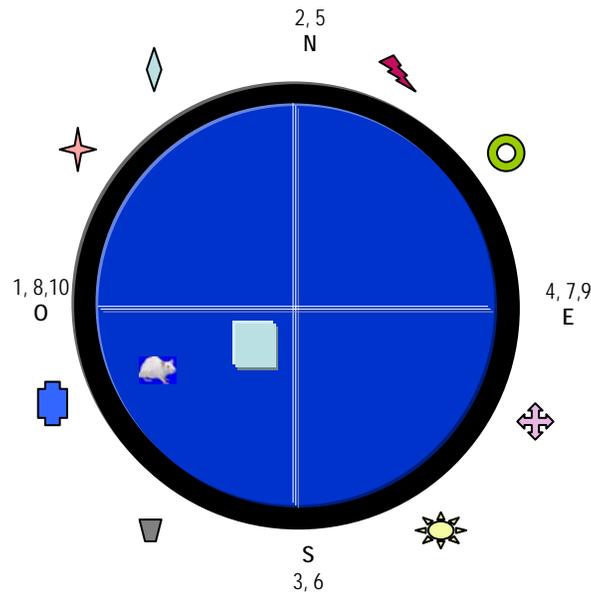


Figura 10. Esquema del laberinto de Morris con los cuatro puntos cardinales (Norte N, Sur, S, Este E y Oeste O). Los esquemas de la periferia, indican las pistas alrededor del LAM, los números, los 10 sitios en donde se coloca la rata al inicio de cada prueba y el cuadrado indica el sitio fijo de la plataforma

V.4. Estudio histológico y de morfometría esterológica

Una vez transcurrido el protocolo del entrenamiento y para dar tiempo a que se produzca el crecimiento de las prolongaciones de las FM, se dejaron los animales en reposo 10 días después de la prueba en las mismas condiciones controladas de bioterio (Ramírez-Amaya et al., 2001). Transcurrido este tiempo todos los animales se procesaron para su análisis histológico, mediante anestesia con pentobarbital sódico (Cheminova, México, S.A), dosis de 40 mg/K, para ser profundidos por vía intracardiaca primero con solución de sulfuro de sodio al 2.34% (J.T.Baker) y fosfato de sodio monobásico (J.T.Baker) al 2.38%, el volumen apropiado de 300 ml, se dejó correr hasta que la base de la dentina (en los dientes incisivos de la rata) se observó oscura. Se continuó con el fijador de Karnovsky (1% de paraformaldehido y 1.25% de glutaraldehído en buffer de fosfatos 0.1M a

pH 7.4) según previo protocolo (Cintra, Aguilar, Granados, Galvan, Kemper, DeBassio, Morgane, Duran y Diaz-Cintra., 1997). Después de la perfusión se extrajeron los encéfalos que una vez pesados se transfirieron a una solución crioprotectora en frascos ámbar que contenían el fijador de Karnovsky y sacarosa al 30% se mantuvieron en la solución durante 72 hr o hasta que el tejido se sumergió al fondo del frasco. En este momento estuvieron listos para su corte al microtomo de congelación.

V.4.1. Corte y tinción (Timm)

En la Figura 11 se indica, el corte de los encéfalos que se prepararon seccionándolos con la ayuda de una matriz bloqueadora para incluir la zona de estudio, al mismo tiempo se fijaron en el soporte con tissu-tek¹ (OCT, compund, Sakura fine thechical Co. Tokio) y se colocaron directamente en el criostato para su congelación, se orientó en ángulo correcto, el encéfalo con relación a la navaja y se obtuvieron secciones coronales de 40 micrometros de grosor. Todos los cortes se colectaron en solución de buffer (0.5M) a temperatura ambiente y de manera seriada. Para su tinción, los cortes se montaron en portaobjetos (tratados con gelatina y sulfato de cromo y potasio (J.T.Baker), siguiendo una estricta seriación, se dejaron secar al aire durante un mínimo de 3 ó un máximo de 7 días previa tinción con la técnica de Timm (West y Hodges-Savola, 1983). Esta tinción histoquímica, precipita los iones del zinc de las FM; por el sulfuro de sodio (J.T.Baker, 3910-01) que se introduce a la rata anestesiada por vía intracardíaca antes de la fijación del cerebro. Sobre la preparación de los cortes frontales del hipocampo, los iones de zinc se diferencian con el nitrato de plata (Baker ACS) y forman los gránulos de sulfuro de zinc que se mantienen estables por la goma arábica (Fermont, México). Para este fin, las preparaciones se colocaron en cajas de tinción sin ningún objeto metálico y se procedió a su diferenciación. Como el principio es un revelado como de una placa de fotografía, tanto los ingredientes como el mezclado de la solución y el tiempo de diferenciación se deben realizar

¹ optimal, cutting, temperatura.

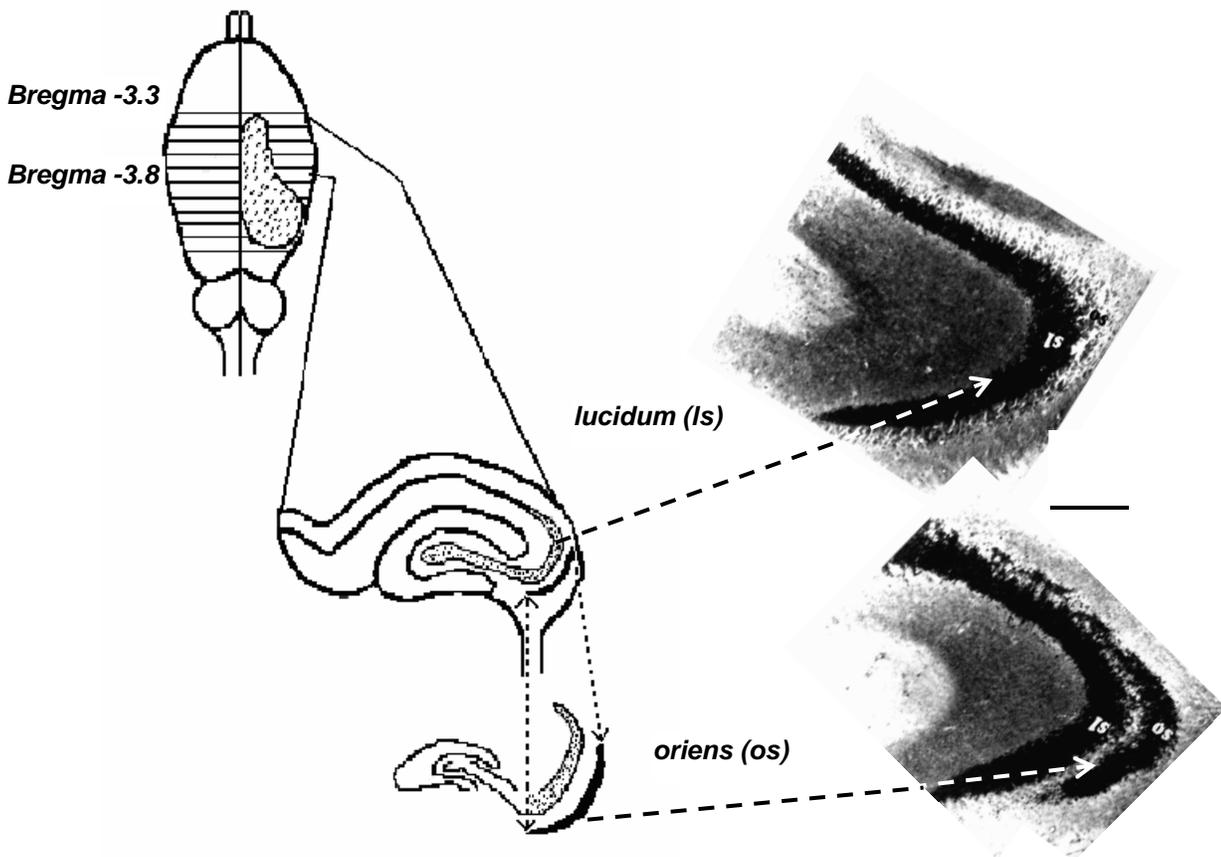


Figura 11. A la izquierda, se indica la vista dorsal del encéfalo, que muestra la región de análisis para el estudio histológico. Las flechas indican las áreas delimitadas de ambos estratos *lucidum* y *oriens*. En la fotografía de la derecha se indican cortes coronales del campo CA3 entre bregma -3.3 a -3.8 en donde se observa el estrato *lucidum* (ls) de un animal control y en B, el crecimiento de las fibras musgosas (sprouting) en el estrato *oriens* (os) del CA3 de una rata joven sometida a sobre entrenamiento (modificado de Ramírez-Amaya et al., 1999). La raya representa 100 μ m.

en la más completa oscuridad. Las laminillas se pueden sacar del revelador para probar el tiempo de la diferenciación, previo lavado con agua de la llave. Se sacan de esta solución cuando adquieren una coloración miel, se lavan y se procede a su deshidratación y montaje con resina sintética (Permunt, Fisher Scientific Co). Una vez secas las preparaciones el sistema de FM presentó una coloración ocre y los estratos del hipocampo en diferentes tonos de amarillo (Figura 12).

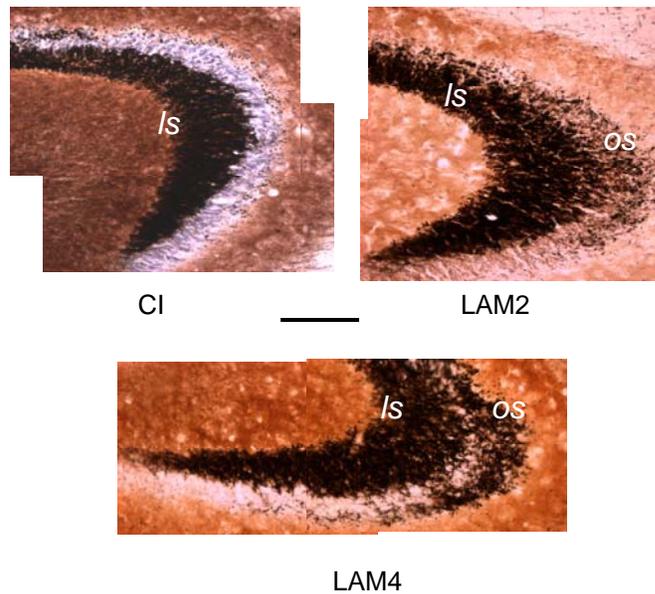


Figura 12. Las ratas control intacto (CI) no aprenden la tarea de LAM y presentan depósitos de zinc normales solo en el estrato *lucidum* (*ls*). El crecimiento progresivo de las FM, ocurre por entrenamiento durante dos días LAM2 en el estrato *oriens* (*os*) y por sobreentrenamiento de dos días mas LAM4 en el CA3. La raya representa 100 μ m.

V.4.2. Análisis estereológico

En cada condición experimental, el nivel del hipocampo se ubicó entre Bregma -3.3 y -3.8 según coordenadas del atlas de Paxinos y Watson (2006), en donde aparece la zona de FM con el crecimiento de proyección a la altura del estrato *oriens*. Se marcaron todas las preparaciones en un nivel equidistante y equivalente con relación a todos los grupos experimentales (CI, CN, LAM2 y LAM4). Una vez identificadas, se procedió a la captura de 6 cortes que incluían al hipocampo dorsal en cada animal, se digitalizaron y se procesaron las zonas de los estratos *lucidum* y *oriens* (Figura 13) con el programa del sistema de imagen Biocom.

A

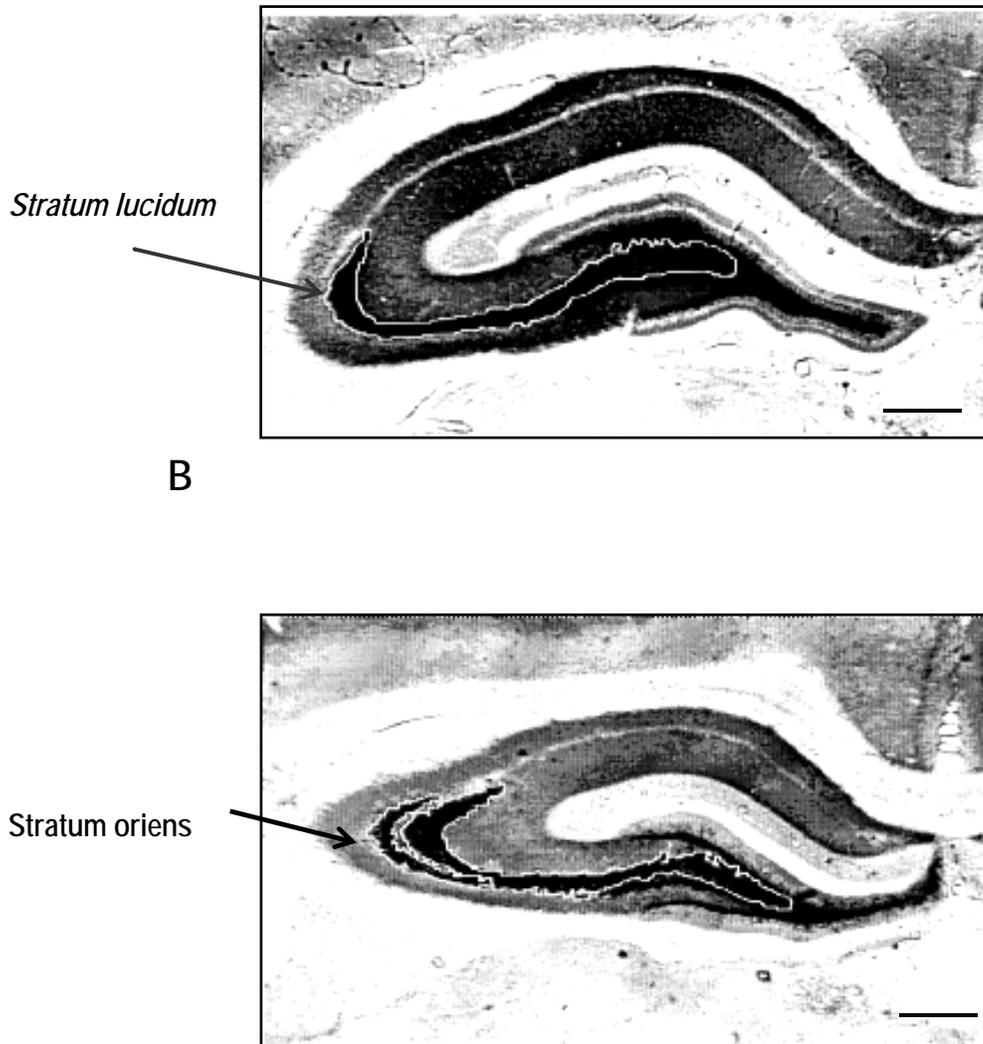


Figura 13. Cortes coronales del hipocampo a 20X teñidos con la técnica de Timm, en donde se delimitó el área de los estratos *lucidum* y *oriens*. En A, animal control y en B, animal sobre entrenado. La raya representa 100 μ m.

V.5. Análisis estadístico

Los resultados de la prueba conductual en el LAM se analizaron con la prueba de ANOVA de medidas repetidas, en donde la variable independiente fueron los diferentes ensayos de prueba y como variable dependiente el tiempo que el animal tardó en llegar a la plataforma de escape (latencia de llegada a la plataforma) durante cada uno de los 10 ensayos de la sesión de entrenamiento y análisis *post hoc* como Scheffe, en los casos en que dicho análisis se consideró apropiado.

Para las áreas de los estratos *lucidum* y *oriens*, el análisis se realizó con una ANOVA de dos vías en donde los dos factores independientes fueron los grupos experimentales y los dos estratos (*lucidum* y *oriens*). Para conocer las diferencias específicas intra grupos se aplicó la prueba *post hoc* de Scheffe. En todos los casos se consideró como significativo el nivel de alfa \leq al 5%.

VI. RESULTADOS

VI.1. Conductuales

Los registros del primer día de los animales de cada grupo control intacto (CI), el control para nado (CN), el grupo entrenado en dos días (LAM2) y sobreentrenado durante cuatro días (LAM4) se muestran en las figuras (14-15) en los 10 ensayos cada uno. En el primer día (LAM2) ningún animal adquirió el aprendizaje solo a partir del segundo día en donde el tiempo se redujo al 30%. En el cuarto día (LAM4) o sobreentrenamiento, todos los animales aprenden y la latencia se redujo en un 75%, lo que indica un mejor aprendizaje.

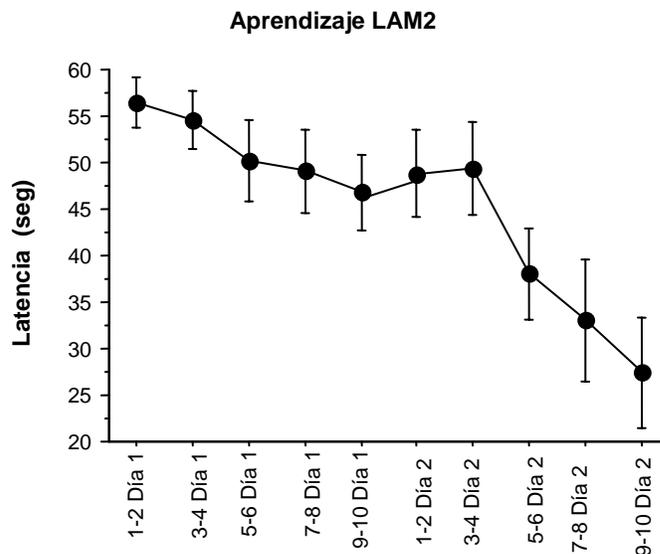


Figura 14. Promedio de latencias, se muestra el entrenamiento de solo 2 días (LAM2) y el promedio de los 10 ensayos por cada animal. Nótese que en el primer día de 60 segundos no hubo aprendizaje en comparación con el día 2 en donde se reduce el tiempo en un 30%. Se indica que hay mayor latencia en el día 1 con respecto a al día 2, y estas diferencias son estadísticamente significativas en los ensayos, 5, 6, 7, 8, 9,10 * $P < 0.002$.

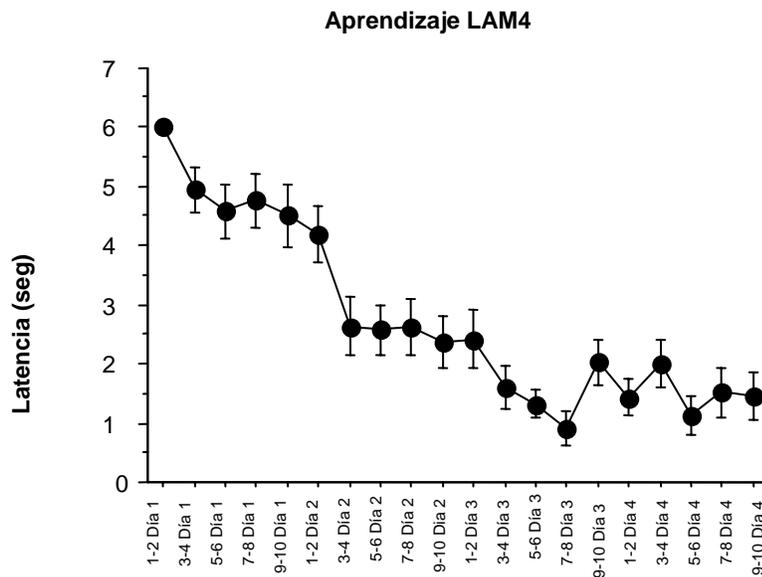


Figura 15. Promedio de latencias del sobreentrenamiento en 4 días (LAM4) con 10 ensayos por animal encontrándose que el aprendizaje se logró en el 40 día al reducirse el tiempo en un 75%. Hay mayor latencia entre el día primero con respecto a los otros 2 y estas diferencias son estadísticamente significativas ($*P < 0.0001$), en los ensayos a 7,8, 9 y 10.

VI.1.1. Aprendizaje

El ANOVA de medidas repetidas de dos días mostró diferencias significativas en los factores estudiados días ($F_{(19,171)} = 2.864$, $P < 0.002$) y el de LAM4 ($F_{(39,312)} = 7.891$, $P < 0.0001$).

VI.1.2. Memoria

En la figura 16, se indica el análisis que se hizo de la memoria de 10 animales entre el promedio del LAM4 de la prueba, las comparaciones se hicieron de los días y la latencia, con el ANOVA de medidas repetidas, el cual mostró diferencias significativas ($F_{(3, 27)} = 14.169$, $P < 0.001$) entre los 4 días. El análisis *post hoc* de Scheffe mostró una disminución del 41.67% significativa ($P < 0.003$) del día 3 con respecto al día 1 y del 67.3% ($P < 0.0001$) del día 4 con respecto al día 1 y una disminución significativa del 61% ($P < 0.0001$) del día 4 con respecto al día 1.

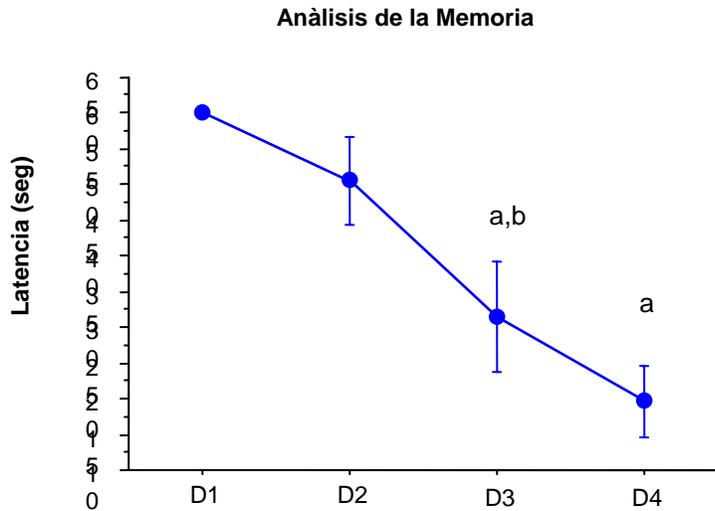


Figura 16. Comparación entre los días de prueba, que mostraron diferencias significativas a, con respecto al D1 y b, con respecto al D2.

VI.2. Análisis anatómico de las FM en los estratos *lucidum* y *oriens*

El análisis de la distribución de las FM del hipocampo en los estratos *lucidum* y *oriens* se muestran en la Figura 13, en donde se observa que en el animal control sólo aparece el estrato *lucidum* y en el animal sobreenentrenado, además del *lucidum*, el estrato en crecimiento es el estrato *oriens*.

VI.2.1. Análisis morfométrico del área de las FM en los estratos *lucidum* y *oriens*

El área de las FM del hipocampo de los estratos *lucidum* y *oriens* se indica en la Figura 17, en donde se observa que el estrato *lucidum* es el triple que el *oriens* en todos los grupos analizados.

El ANOVA de las comparaciones del área del estrato *lucidum* entre los cuatro grupos experimentales (CI, CN, LAM2 y LAM4) mostró diferencias significativas ($F_{(3,116)} = 4.7836$, $P < 0.0035$). El análisis *post hoc* de Scheffe entre los grupos, indicó que el grupo CN tuvo una disminución del 6.22% significativa ($P < 0.04$) con respecto al grupo CI. Por el contrario, los grupos LAM2 y LAM4 mostraron aumentos significativos del 4.4% ($P < 0.008$) y del 10.16% ($P < 0.0025$), respectivamente con respecto al grupo CN.

VI.2.2. Área total medida del estrato *oriens* en los 4 grupos experimentales

El ANOVA de las comparaciones del área del estrato *oriens* entre los cuatro grupos experimentales (CI, CN, LAM2 y LAM4) mostró diferencias significativas ($F_{(3,116)} = 21.54$, $P < 0.0001$). Con referencia al grupo CI, el análisis *post hoc* de Scheffe mostró un aumento del 57.89% significativo ($P < 0.004$) del grupo CN; y de los grupos LAM2 y LAM4 con incrementos del 136.84% ($P < 0.0001$) y 126.87% ($P < 0.0001$), respectivamente. Las comparaciones de los grupos LAM2 y LAM4 con respecto al grupo CN fueron aumentos del 50% ($P < 0.0001$) y del 43.3% ($P < 0.0004$), respectivamente (Figura 17).

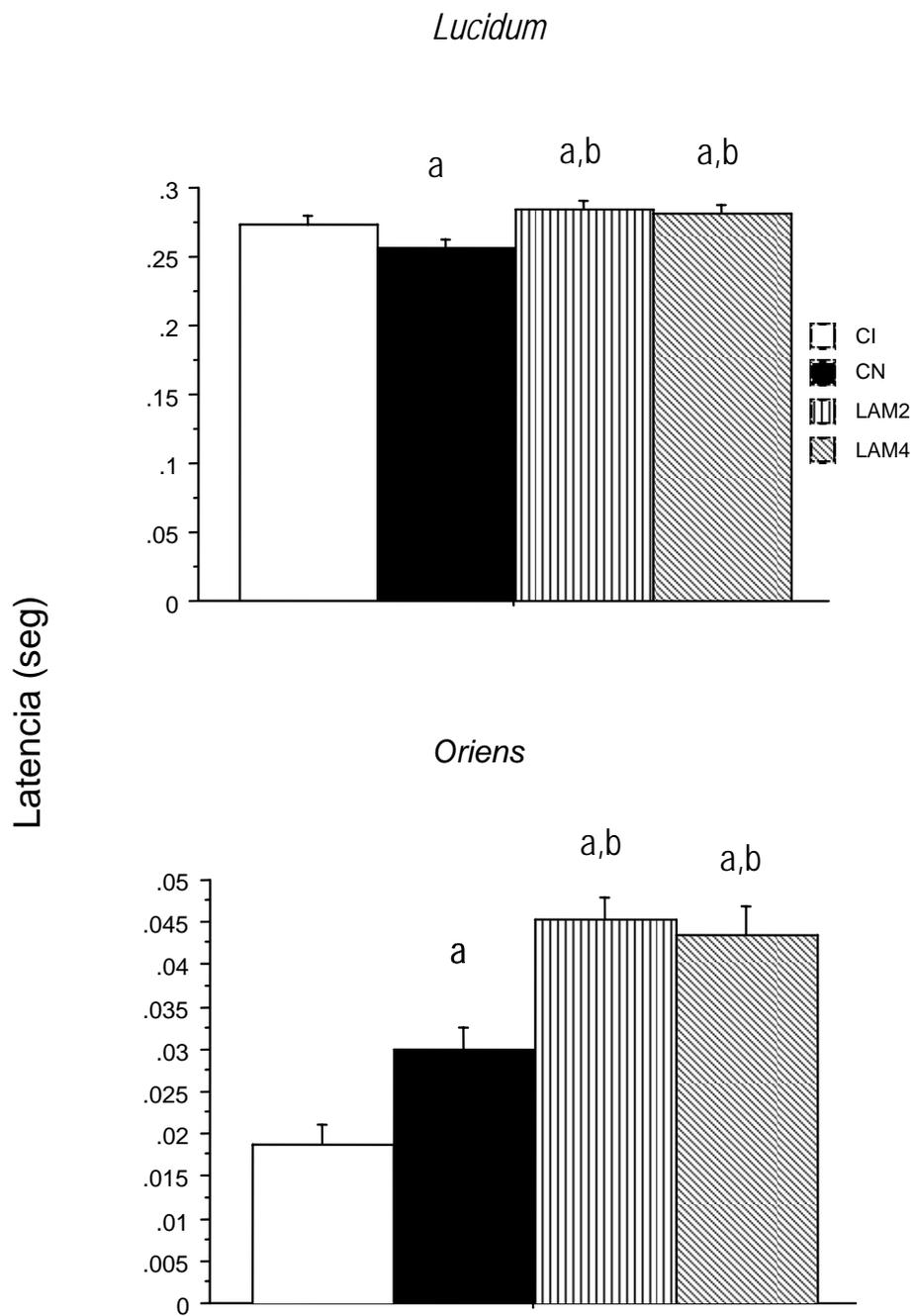


Figura 17. Promedio de las áreas de los estratos *lucidum* y *oriens* respectivamente en mm² en las diferentes condiciones control intacto (CI), control de nado (CN), entrenamiento de 2 días (LAM2) y de 4 días (LAM4) * p < 0.001.

VII. DISCUSION

Los resultados del presente estudio indican que el sustrato sináptico anatómico del hipocampo entre las fibras musgosas (FM) y el CA3 se preserva en animales adultos maduros de 230 días de edad. Capacidad asociada por la respuesta a la tarea de aprendizaje y memoria de tipo espacial utilizando el laberinto acuático de Morris (Crusio y Schwegler, 2005). Se confirma que en animales adultos maduros, este sustrato anatómico es estable y conserva su capacidad plástica de axogénesis de las FM provocada por la tarea de tipo espacial y por el sobreentrenamiento de la misma, lo que provoca este crecimiento axonal de fibras amielínicas provenientes de las células granulares existentes o probablemente de nuevas FM provenientes de nuevas células granulares que presentan neurogénesis como mecanismo de adaptación a las condiciones cambiantes del medio ambiente (Parent, et al., 1997; Holtmaat, et al., 2005; Wang et al, 2006). Este efecto se valoró en ambos estratos (*lucidum* y *oriens*), encontrándose que mayor plasticidad de respuesta en el estrato *oriens* como fue descrita por Ramírez-Amaya et al, (1999); Ramírez-Amaya, Marrone, Gage, Worley y Barnes (2006) quienes utilizaron el mismo paradigma del sobreentrenamiento en el laberinto acuático de Morris pero en animales jóvenes. Por los resultados obtenidos y las diferencias significativas suponemos que la generación de nuevas FM en el estrato *oriens* esta puede deberse a una de tres causas: Porque la axogénesis puede aparecer o desaparecer, como producto de la experiencia sensorial del individuo a lo largo de su vida o bien por los periodos críticos del desarrollo posnatal que en murinidos como la rata ocurre durante los periodos perinatales y que puede conservarse hasta la vida adulta. Este efecto lo pudimos observar en el grupo de animales intactos (CI), quienes suponemos, habrían acumulado una serie de memorias asociadas a los estímulos medio ambientales y que a lo largo de su vida produjeron un crecimiento en el estrato *oriens*. Otra causa y adicional a ésta, se considera aquella debida al estrés provocada al ser colocadas en un ambiente novedoso primero de haber sido aisladas y colocadas para su habituación en otro ambiente y luego al ser colocadas en el agua como se observa en el grupo control de nado. Este efecto es

contrario a lo que ocurre en el estrato *lucidum* de este mismo grupo experimental (CN). El tercer efecto, y sin duda alguna, se debe al sobreentrenamiento de esta prueba conductual que produce un aumento en ambos estratos a partir del segundo día de entrenamiento, y aunque este efecto no puede seguirse en un mismo animal por ser grupos independientes, se puede apreciar el efecto agregado de la adquisición del aprendizaje asociado al aumento del área en el estrato *oriens* que se alcanza desde el segundo día y es al doble del animal intacto y del control de nado como puede verse en la figura 17.

Con respecto al primer efecto, es importante anotar que el crecimiento de las FM es un evento de plasticidad asociado a la experiencia tanto sensorial como de aprendizaje. Comprobando que el sustrato anatómico del hipocampo con referencia a esta sinapsis FM-CA3 es estable en el animal adulto maduro, presenil y que quizás se conserve en el senil, según se reportó en el 2001 por Poe et al. Asimismo, es más plástico en etapas de desarrollo y durante la juventud incluso se modifica según sea la variedad de rata albina (Wistar) o Long-Evans (Holahan et al., 2007). Es importante considerar que la mayoría de los estudios se llevan a cabo en animales entre 200 a 300 gr, que correspondería a una edad de 90 días aproximadamente.

Con respecto al segundo caso el estrés provoca el doble del crecimiento de las FM generadas con solo ser colocadas en el agua, efecto que no pudimos sospechar al proponer el diseño experimental y haber medido los niveles de corticosteroides circulantes, dado que no había en la literatura algún dato relacionado con este hecho en adultos maduros ni en preseniles. Así, sería el estrés en todo caso un efecto adicional al sobreentrenamiento, pero lo más importante es que la plasticidad sináptica del hipocampo y al menos entre esta FM y el CA3 es un evento altamente preservado en animales adultos maduros, preseniles y quizás en seniles. Aunque se sabe en la literatura, que bajo condiciones de estrés los animales adultos maduros y preseniles muestran una reducción de la eficiencia sináptica valorada por la LTP y la LDP, este efecto se revierte cuando el animal adulto maduro y presenil, se coloca en ambientes sensorialmente enriquecidos (Yang, Hou, Liu, Shang, Shou, Xu y Li 2007).

Numerosos estudios indican estas deficiencias particularmente en las células de proyección del CA1 y de las piramidales corticales, que en esencia son células más sensibles por el grado de especialización a las que se les asocia.

En el tercer caso, pudimos comprobar la hipótesis propuesta de que el sobreentrenamiento aumenta el sustrato anatómico asociado a la capacidad de aprendizaje. Además que este efecto fue diferente en ambos estratos y en los 3 grupos experimentales. Es importante mencionar, que las condiciones de la prueba son las óptimas descritas en numerosos experimentos en donde se controlan estas variables y se discuten los efectos asociados al estrés. También y por los efectos con el ciclo estral (estrógenos y plasticidad sináptica de las células piramidales del hipocampo), se utilizaron solo machos en nuestro estudio. Por lo que se podría esperar que este efecto se preservara en las hembras adultas maduras y preseniles en donde quizás no se presente la influencia de las hormonas estrogénicas por su grado de hipoestrogenismo producto de la edad.

Por otra parte, se sabe que para la integración y la consolidación de la memoria espacial se requiere no solo de la integridad del circuito intrasináptico del hipocampo sino además de que se conserve la plasticidad de sus células. Sobre todo de la entrada del patrón perforante al giro dentado y al CA3 en donde se integra la respuesta a la experiencia sensorial, reactiva a los cambios del medio ambiente a los que el organismo deberá su adaptación adecuada (Guzowski, McNaughton, Barnes y Worley, 1999). Así, en la literatura se reporta que estos efectos dependen en buena medida de la capacidad plástica de las células que lo forman, dentro de las cuales son las granulares los principales protagonistas, por ser además las que conservan la neurogénesis y ser el origen de las fibras musgosas que conectan con el CA3. Evidencia reciente indica que incluso el sobreentrenamiento en cualquiera de las tareas que miden memoria espacial, las neuronas nuevas se integran a los circuitos ya establecidos incluso cuando el animal se coloca en ambientes novedosos y/o estresantes, por la capacidad de la expresión de nuevos genes (como el Arc5 y Hammer1) y que además pueden tener un rol importante en la estabilización de las sinapsis que se requieren para la consolidación de la memoria espacial (Ramírez-Amaya et al, 2006).

En nuestro estudio, el análisis de las áreas del crecimiento de las FM encontrada, muestra por una parte la experiencia sensorial del animal acumulada por la edad y por otra parte la respuesta plástica del sustrato anatómico como respuesta al cambio de ambiente (otro cuarto y la exposición al agua). Así, en el grupo del control de nado, reflejó esta sensibilidad por el cambio del ambiente.

Las observaciones de la adquisición del aprendizaje indican que desde el 2º día del entrenamiento los animales aprenden, porque la latencia de llegada a la plataforma de escape se redujo a menos de 20 seg en los días 3 y 4, que se consideran de sobreentrenamiento. Las diferencias estadísticas con la ANOVA de medidas repetidas indican diferencias estadísticamente significativas. Además, se hicieron las comparaciones entre los días de prueba para poder considerar si hubo memoria al menos de corto plazo, entre el día 1 al día 2 y del sobreentrenamiento entre los días 3 con respecto al día uno y al dos y del 4 con respecto al día uno, como se indica en las gráficas. Se consideró en este estudio trabajos previos en donde se considera sobreentrenamiento toda vez que el animal ha aprendido la tarea, los demás días son considerados sobreentrenamiento.

La medición total de cada estrato indicaron una mayor área estadísticamente significativa del 12.41% del estrato *lucidum* en relación al *oriens* en todos los grupos analizados (ver gráficas). Por otra parte, cuando se analizan los grupos control intacto vs el control de nado se observan diferencias significativas en ambos estratos, este dato y como ya se mencionó podría indicar que hay una influencia del ambiente novedoso y de la experiencia del nado, que produjo una axogénesis del 57.89% la cual es estadísticamente significativa en el estrato *oriens*. Sin embargo, en el estrato *lucidum* ocurre lo contrario hay una reducción del 7.32% que resultó ser estadísticamente significativa.

Las comparaciones anatómicas del área entre los grupos entrenados en 2 y 4 días con referencia al control intacto, indican que el estrato *oriens* es el que mayor respuesta plástica presenta valorada por el aumento significativo del área en un 136.84% en el día 2 y del 126.315% en el día 4 ambos datos fueron estadísticamente significativos. Por otra parte, en el estrato *lucidum* los aumentos significativos se localizaron al comparar los grupos control de nado y los

entrenados en 2 días y 4 días con incrementos del 11.32% y del 10.15%, respectivamente. La persistencia de estos cambios en el sustrato anatómico se podría valorar estudiando animales seniles, estudios que hemos diseñado y en donde esperamos encontrar la reducción de la plasticidad por envejecimiento acompañado del estrés oxidativo, el cual puede retardarse con la administración de antioxidantes o bien con suplementación estrogénica en hembras seniles en donde no se sabe si esta plasticidad se conserva (datos no publicados).

Bajo esta perspectiva anatómica y considerando los reportes consistentes de la literatura (Crusio y Schwegler, 2005) y en donde se indica la plasticidad axogénica de las FM en el estrato *oriens* (Ramírez-Amaya et al., 1999; Balderas, et al., 2004) los resultados se pueden discutir a partir de dos aspectos: Uno con referencia a la prueba de memoria de tipo espacial con el LAM y otro debido al estrés que se produce solo al introducir al animal adulto maduro al agua, valorado por las diferencias significativas encontradas entre estos grupos (CN vs LAM2 y LAM4), asociado a la capacidad de aprendizaje adquirida en el día 2 de entrenamiento, (ver gráfica de memoria) y donde se extinguió el tiempo de llegada a la plataforma de escape, indicando un aprendizaje acompañado de memoria a corto plazo. El otro aspecto tiene que ver con la prueba misma del sobreentrenamiento, dadas las diferencias significativas entre los días 2 y 4 con referencia al día uno, en efecto, el crecimiento de las FM ocurre desde el día 2 por el sobre entrenamiento asociado a la mejor ejecución de la tarea.

Es interesante analizar que en la población de animales intactos, se constató la preservación de la plasticidad sináptica por el crecimiento de las FM en el estrato *oriens*, como se indica en la figura 17, y como ya se mencionó, suponemos que la edad es otro factor que produce este sprouting de las FM siendo producto de las células granulares, tanto de las ya existentes, como quizás de la neurogénesis hipocámpal que se sabe se mantiene a lo largo de la vida del individuo. Pero existe mucha discusión al respecto porque no se sabe cuándo estas nuevas neuronas se integran funcionalmente a la red neuronal existente, aunque hay evidencia de los cambios graduales y progresivos de una serie de parámetros electrofisiológicos y anatómicos (Esposito, Piatti, Laplagne, Morgenstern, Ferrari,

Pitossi y Schinder. 2005). Se sabe por ejemplo, que en el cerebro adulto, el proceso de maduración de las nuevas células es más lento (Rao, Hattiangady, Abdel-Rahman, Stanley y Shetty. 2005), medido por el establecimiento de sus proyecciones y la aparición de espinas dendríticas, así como la respuesta electrofisiológica característica de las neuronas maduras en el hipocampo (Ambrogini, Lattanzi, Ciuffoli, Agostini, Bertini, Stocchi, Santi y Cuppini. 2004). Se sabe también que aunque la mayoría muere durante el primer mes de nacidas, sobreviven por la experiencia sensorial o conductual, evidenciando su integración funcional a circuitos neurales existentes (Jessberger y Kempermann, 2003). Este hecho se ha estudiado en experimentos de Ramirez-Amaya, et al., (2006) quienes proponen que las células nuevas si maduran, y presentan una alta probabilidad para responder a la conducta de exploración por ser mas plásticas (Schmidt-Hieber, Jonas y Bischofberger 2004) y por responder a la alta sensibilidad a la ejecución de pruebas conductuales como el LAM (Kee, Teixeira, Wang y Frankland, 2007). Por otra parte, se sabe que el número de células no se reduce con la edad, en el hipocampo. Esto ocurre en varias especies, roedores, monos y seres humanos (Chawla y Barnes, 2007), lo que ocurre es que se declina la tasa de neurogénesis con la edad, siendo menor en animales seniles en comparación con animales adultos (Small, Chawla, Buonocore, Rapp y Barnes. 2004). Con la edad se pierden capacidades cognoscitivas, esto es cierto cuando se analiza cortezas y áreas de asociación como la prefrontal. Por lo tanto, se requiere de estudios más profundos en donde se incorpore la forma en cómo se integran funcionalmente estas células nuevas a la red hipocampal y al respecto, las estrategias metodológicas se refieren al estudio de la transcripción de ARN mensajeros de genes de expresión inmediata como cFos, Zif 268 ((Jessberger y Kempermann, 2003)) Homer 1a (Vazdarjanova, McNaughton, Barnes, Worley y Guzowski, 2002) y Arc4 (Guzowski et al., 1999), que permitan identificar esta relación de activación celular con los eventos conductuales.

Los resultados del presente trabajo abundan en la relación anatómica de la plasticidad de las FM del hipocampo con una tarea de memoria espacial en animales adultos maduros, en donde se conserva la respuesta plástica de estas

FM (Poe et al., 2001). Pero permanece por estudiar los mecanismos celulares que subyacen a esta plasticidad observada.

Existen diferentes tipos de pruebas conductuales que permiten medir el proceso de aprendizaje y memoria, sin embargo, se debe ser cauto en la interpretación de los resultados ya que también se mezclan estados emocionales y motivaciones que son consecuencia de los estímulos medio ambientales que se procesan en diferentes áreas cerebrales. De hecho, también hay que considerar las condiciones en las que crecen los sujetos de experimentación para pruebas de aprendizaje. En especial en los roedores, que crecen en condiciones controladas de bioterio, desde el espacio en el que se desarrolla el organismo, hasta si vive aislado o en ambientes enriquecidos. Los resultados de estas pruebas pueden variar de manera considerable cuando los animales han vivido socializados (dos individuos por caja), aislados o sobre estimulados. Así mismo, la edad es otro de los factores que son críticos para la interpretación de los cambios celulares por pruebas de laberinto y en donde se reconocen dos tipos de factores; dependientes e independientes de la edad.

VIII. CONCLUSIONES

Las ratas macho adultos maduros mantienen la axogénesis en el hipocampo provocada por sobreentrenamiento de la tarea de tipo espacial.

Los animales adultos maduros, aprenden la tarea espacial a partir del segundo día de entrenamiento y conservan la estabilidad del sustrato anatómico entre la fibra musgosa y el CA3.

El aumento del área del estrato *oriens* es más evidente que la del *lucidum* en los animales adultos maduros sobreentrenados.

El crecimiento de las fibras musgosas de animales adultos maduros hacia el estrato *oriens* se origina de las células granulares existentes y probablemente también de las que se generaron durante el periodo de la tarea de entrenamiento.

El uso del método de Timm es ideal para correlacionar el estudio anatómico con el conductual ya que delimita área de los estratos *lucidum* y *oriens* en los animales adultos maduros con o sin entrenamiento.

IX. REFERENCIAS

- Adams B, Lee-M, Fahnestock M y Racine RJ. 1997. Long-term potentiation trains induce mossy fiber sprouting. *Brain Res.* **775**: 193 – 197.
- Alyan SH, Jander R y Best PJ. 2000. Hippocampectomized rats can use a constellation of landmarks to recognize a place. *Brain Res.* **876**: 225-237
- Amaral D y Witter MP. 1995. Hippocampal Formation in: Paxinos, G. (ed): The rat nervous system. San Diego, Academic Press. 443-493.
- Amaral DG y Dent JA. 1981. Development of the mossy fibers of the dentate gyrus: I. A light and electron microscopic study of the mossy fibers and their expansions. *J. Comp. Neurol.* **195**: 51-86.
- Ambrogini P, Lattanzi D, Ciuffoli S, Agostini D, Bertini L, Stocchi V, Santi S y Cuppini R. 2004. Morpho-functional characterization of neuronal cells at different stages of maturation in granule cell layer of adult rat dentate gyrus. *Brain Res.* **1017**: 21-31.
- Bailey CH y Kandel ER. 1993. Structural changes accompanying memory storage. *Annu. Rev. Physiol.* **55**: 397–426.
- Balderas I, Ramírez-Amaya V y Bermudez-Rattoni F. 2004. Memory-linked morphological changes. *Revisión en Neurociencia.* **38**: 944-948.
- Becker JT, Walker JA y Olton DS. 1980. Neuroanatomical bases of spatial memory. *Brain Res.* **200**: 307-320.
- Ben-Ari Y y Represa A. 1990. Brief seizure episodes induce long-term potentiation and mossy fiber sprouting in the Hippocampus. *Tins.* **13**: 312-328.
- Bortolotto ZA, Lauri S, Isaac JTR y Collingridge GL. 2003. Kainate receptors and the induction of mossy fibre long-term potentiation. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **358**: 657-666.
- Cajal RS. 1892. Estructura del cuerno de Ammon. *Revista de Ciencias Médicas de Barcelona.* **3**: 42.
- Cavazos JE, Golaraja G y Sutula TP. 1991. Mossy fiber synaptic reorganization induced by kindling: time course development, progression, and permanence. *J. Neurosci.* **11**: 2795 –2803.
- Chawla MK y Barnes CA. 2007. Hippocampal granule cells in normal aging: insights from electrophysiological and functional imaging experiments. *Prog. Brain Res.* **163**: 661-821.
- Cintra L, Aguilar A, Granados L, Galvan A, Kemper T, DeBassio W, Galler J, Morgane P, Duran P y Díaz-Cintra S. 1997. Effects of prenatal protein malnutrition on mossy fibers of the hippocampal formation in rats of four age groups. *Hippocampus.* **7**:184–191.

- Claiborne BJ, Xiang Z y Brown TH. 1993. Hippocampal circuitry complicates analysis of long-term potentiation in mossy fiber synapses. *Hippocampus*. **3**: 115-121.
- Clark RE, Broadbent NJ y Squire LR. 2007. The hippocampus and spatial memory: findings with a novel modification of the water maze. *J. Neurosci*. **27**: 6647-6654.
- Crusio WE y Schwegler H. 2005. Learning spatial orientation tasks in the radial-maze and structural variation in the hippocampus in inbred mice. *Behav. Brain Funct*. **22**: 1-3.
- Debanne D, Gähwiler BH y Thompson SM. 1999. Heterogeneity of synaptic plasticity at unitary CA3-CA1 and CA3-CA3 connections in rat hippocampal slices cultures. *J. Neurosci*. **19**: 10664-10671.
- DeKloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS y Joels M. 1998. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr. Rev*. **19**: 269-301.
- Deller T y Frotcher M. 1997. Lesion-induced plasticity of central neurons: sprouting of single fibers in the rat hippocampus after unilateral entorhinal cortex lesion. *Progr. Neurobiol*. **53**: 687-727.
- Deller T, Bas Orth C, Vlachos A, Merten T, Del Turco D, Dehn D, Mundel P y Frotcher M. 2007. Plasticity of synaptopodin and the spine apparatus organelle in the rat fascia dentata following entorhinal cortex lesion. *Ann Anat*. **189**:5-16.
- Eichenbaum HA, Fagan P, Mathews y Cohen NJ. 1988. Hippocampal system dysfunction and odor discrimination learning in rats: Impairment or facilitation depending on representational demands. *Behav. Neurosci*. **102**: 331-339.
- Escobar ML, Barea-Rodríguez EJ, Derrick BE, Reyes JA y Martínez JL Jr. 1997. Opioid receptor modulation of mossy fiber synaptogenesis: independence from long-term potentiation. *Brain Res*. **751**: 330-335.
- Esposito MS, Piatti VC, Laplagne DA, Morgenstern NA, Ferrari CC, Pitossi FJ y Schinder AF. 2005. Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *J. Neurosci*. **25**: 10074-10086.
- Franck JE, Pokorny J, Kunkel DD y Schwartzkroin PA. 1995. Physiologic and morphologic characteristics of granule circuitry in human epileptic hippocampus. *Epilepsia*. **36**: 543-58.
- Federickson CJ y Moncrieff DW. 1994. Zinc-containing neurons. *Biol. Signals*. **3**: 127-139.
- Forbes RJ, Bennett ME, Lynch SA, Sonntag CD y Riddle WE. 2001. Prenatal stress induces learning deficits and is associated with a decrease in granules and CA3 cell dendritic tree size in rat hippocampus. *Anat Sci Int*. **82**:211-217.

- Frotscher M, Jonas P y Sloviter RS. 2006. Synapses formed by normal and abnormal hippocampal mossy fibers. *Cell Tissue Res.* **326**:361-367.
- Gage FH. 2002. Neurogenesis in the adult brain. *J. Neurosci.* **1**: 612-613.
- Geinesman Y, deToledo-Morrell L, Morrell F Persina IS y Beatty MA. 1996. Synapse restructuring associated with the maintenance phase of hippocampal long-term-potential. *J. Comp. Neurol.* **368**: 413-423.
- Gold JJ, Hopkins RO y Squire LR. 2006. Single-item memory, associative memory, and the human hippocampus. *Learn. Mem.* **13**: 644-649.
- Golgi C. 1886. Sulla fina anatomia degli organi centrali del sistema nervoso, *U. Hoepli Milano.*
- Gundersen HJG y Jensen EB. 1987 The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J. Microsc.* **147**: 229-263.
- Guzowski JF, McNaughton BL, Barnes CA y Worley PF. 1999. Environment-specific expression of the immediate-early gene Arc in hippocampal neuronal ensembles. *Nat. Neurosci* **2**:1120-1124.
- Henze DA, Urban NN, y Barrionuevo G. 2000. The Multifarious hippocampal mossy fiber pathway: A review. *Neuroscience.* **98**: 407-427.
- Holahan MR, Honegger KS y Ruttenberg A. 2007. Expansion and retraction of hippocampal mossy fibers during postweaning development: Strain-specific effects of NMDA receptor blockade. *Hippocampus.* **17**: 58-67.
- Holahan MR, Rekart JL, Sandoval J y Routtenberg A. 2006. Spatial learning induces presynaptic structural remodeling in the hippocampal mossy fiber system of two rat strains. *Hippocampus.* **16**: 560-570.
- Holtmaat AJ, Trachtenberg JT, Wilbrecht L, Shepherd GM, Zhang X, Knott GW y Svoboda K. 2005. Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo. *Neuron.* **45**: 279-291.
- Hosseini-Sharifabad M y Hadinedoushan H, 2007. Prenatal stress induces learning deficits and associated with a decrease in granules and CA3 cell dendritic tree size in rat hippocampus. *Anat. Sci. Int.* **82**:211-217.
- Jessberger S y Kempermann G. 2003. Adult-born hippocampal neurons mature into activity-dependent responsiveness. *Eur. J. Neurosci.* **18**: 2707-2712.
- Kee N, Teixeira CM, Wang AH y Frankland PW. 2007. Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus. *Nat. Neurosci.* **10**: 355-362.

- Kempermann G, Jun HG y Cage FH. 1997. Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. *PNAS. USA.* **94**: 10409-10414.
- Kerr AM y Jonas P, 2008. The two sides of hippocampal mossy fiber plasticity. *Neuron* **57**:5-7.
- Kim JJ, Koo KW, Lee HJ y Han JS, 2005. Amygdalar inactivation blocks stress-induced impairments in hippocampal long-term potentiation and spatial memory. *J Neurosci.* **9**:1532-1539.
- Kleim JA, Lussnig E, Schwarz ER, Comery TA y Greenough WT. 1996. Synaptogenesis and FOS expression in the motor cortex of the adult rat after motor skill learning. *J. Neurosci.* **16**: 4529-4535.
- Knierim JJ y McNaughton BL. 2001. Hippocampal place-cell firing during movement in three-dimensional space. *J Neurophysiol.* **85**:105-116.
- Kogan I, y Richert-Levine G. 2008. Activation pattern of the limbic system following spatial learning under stress. *Eur. J. Neurosci.* **27**:715-722.
- Leuner B, Falduo J y Shors TJ. 2003. Associative memory formation increases the observation of dendritic spines in the hippocampus. *J. Neurosci.* **3**:659-665.
- Lim C, Blume HW, Madsen JR y Saper CB. 1997. Connections of the hippocampal formation in humans: I. The mossy fiber pathway. *J. Comp. Neurol.* **385**:325-351.
- Liu CN y Chambers WW. 1958. Intrasprouting of dorsal root axons. *Arch. Neurol. Psychiatry.* **79**: 46-61.
- Lopez-Garcia C, Molowny A, Ponsoda X, Nacher J y Sancho-Bielsa F. 2001. Synaptic zinc in the central nervous system. *Rev Neurol.* **33**: 341-347.
- Lorente de No R. 1934. Studies on the structure of the cerebral cortex-II. Continuation of the study of the ammonic system. *J. Psychol. Neurol. Lpz.* **46**: 113-177.
- Magarinos AM y McEwen BS. 1995. Stress-induce atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors. *Neuroscience.* **69**: 89-98.
- Martinez I, Quirarte GL, Diaz-Cintra S, Quiroz C y Prado-Alcala RA. 2002. Effects of lesions of hippocampal fields CA1 and CA3 on acquisition of inhibitory avoidance. *Neuropsychobiology.* **46**: 97-103.
- McEwen BS, Weiss J y Schwartz L. 1968. Selective retention of corticosterone by limbic structures in rat brain. *Nature.* **220**: 911-912.
- McEwen BS. 2001. Stress, sex, hippocampal plasticity: relevance to psychiatric disorders. *Clin. Neurosci. Res.* **1**: 19-34.

- Morimoto K, Fahnestock M y Racine RJ. 2004. Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Prog. Neurobiol.* **73**: 1-60.
- Moser MB y Moser EI. 1998. Distributed encoding and retrieval of spatial memory in the hippocampus *J. Neurosci.* **18**: 7535–7542.
- Moser MB, Trommald M y 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. *PNAS.* **91**: 12673-12675.
- Muller D, Toni N y Buchs PA. 2000. Spine changes associated with long-term potentiation. *Hippocampus.* **10**: 596-604.
- Nadel L y Eichenbaum H. 1999. Introduction to the special issue on place cells. *Hippocampus.* **9**: 341-345.
- Niquet J, Jorquera I, Faissner A, Ben-Ari Y y Represa A. 1995. Gliosis and axonal sprouting in the hippocampus of epileptic rats are associated with an increase of tenascin-C immunoreactivity. *J. Neurocytol.* **24**: 611–624.
- Nicoll RA y Schmitz D. 2005. Synaptic plasticity at hippocampal mossy fiber synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* **6**:863-876.
- O'Keefe J, Burgess N, Donnet JG, Jeffery KJ y Maguire EA. 1998. Place cells, navigational accuracy, and the human hippocampus. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **353**: 1333-1340.
- O'Keefe J y Nadel L. 1978. The hippocampus as a cognitive map. London: Oxford University Press.
- O'Keefe JA y Dostrovsky J. 1971. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res.* **34**: 171-175.
- O'Malley A, O'Connell C, Murphy KJ y Regan CM. 2000. Transient spine density increase in the mid-molecular layer of hippocampal dentate gyrus accompanies consolidation of a spatial learning task in the rodent. *Neuroscience.* **99**: 229-232.
- Olton DS. 1977. Spatial memory. *Sci. Am.* **236**: 82-98.
- Ottersen OP, Torp R y Storm-Mathisen J. 1989. New aspects of the pathogenesis of ischemic brain damage. Possible involvement of excitatory amino acids. *Tidsskr Nor Laegeforen.* **109**: 2674-2677.
- Parent JM, Tada E, Fike JR y Lowenstein DH. 1999. Inhibition of dentate granule cell neurogenesis with brain irradiation does not prevent seizure-induced mossy fiber synaptic reorganization in the rat. *J. Neurosci.* **19**: 4508-4519.

- Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS y Lowenstein DH. 1997. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J. Neurosci.* **17**: 3727-3738.
- Patanow CM, Day JR y Billingsley ML. 1997. Alterations in hippocampal expression of SNAP-25, GAP-43, stannin and glial fibrillary acidic protein following mechanical and trimethyltin-induced injury in the rat. *Neuroscien.* **76**:187-202.
- Paxinos G y Watson C. 2006. The rat brain in stereotaxic coordinates. Ed. 6. London: Academic Press.
- Pfeiffer CC y Braverman ER. 1982. Zinc, the brain and behavior. *Biol. Psychiatry.* **17**: 513-532.
- Poe BH, Linville C, Riddle DR, Sonntag WE y Brunso-Bechtold JK. 2001. Effects of age and insulin-like growth factor-1 on neuron and synapse numbers in area CA3 of hippocampus. *Neuroscience.* **107**:231-238.
- Raisman G. 1969. Neuronal plasticity in the septal nuclei of the adult rat. *Brain Res.* **14**: 25-48.
- Ramirez-Amaya V, Balderas I, Sandoval J, Escobar ML y Bermudez-Rattoni F. 2001. Spatial long-term memory is related to mossy fiber synaptogenesis. *J. Neurosci.* **21**: 7340-7348.
- Ramirez-Amaya V, Escobar ML, Chao V y Bermudez-Rattoni F. 1999. Synaptogenesis of mossy fibers induced by spatial water maze overtraining. *Hippocampus.* **9**: 631-636.
- Ramirez-Amaya V, Marrone DF, Gage FH, Worley PF y Barnes CA. 2006. Integration of new neurons into functional neural networks. *J. Neurosci.* **26**: 12237-12241.
- Rampon C. y Tsien JZ. 2000. Genetic analysis of learning behavior-induced structural plasticity. *Hippocampus.* **10**: 605-609.
- Rao MS, Hattiangady B, Abdel-Rahman A, Stanley DP y Shetty AK. 2005. Newly born cells in the ageing dentate gyrus display normal migration, survival and neuronal fate choice but endure retarded early maturation. *Eur. J. Neurosci.* **21**: 464-476.
- Rekart JL, Sandoval CJ y Routtenberg A. 2007. Learning-induced axonal remodeling: Evolutionary divergence and conservation of two components of the mossy fiber system within Rodentia. *Neurobiol. Learn. Mem.* **87**: 225-235.
- Represa A, Le Gall La Salle y Ben-Ari Y. 1989. Hippocampal plasticity in the kindling model and epilepsy in rats. *Neurosci. Lett.* **99**: 345-350.
- Robain O, Barbin G, Billette de Villemeur T, Jardin L, Jahchan T y Ben-Ari Y. 1994. Development of mossy fiber synapses in hippocampal slice culture. *Brain Res Dev Brain Res.* **80**: 244-250.

- Rosenzweig ES y Barnes CA, 2003 Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Prog Neurobiol.* **69**:143-179.
- Ross RT, Orr WB, Holland PC y Berger TW. 1984. Hippocampectomy disrupts acquisition and retention of learned conditional responding. *Behav. Neurosci.* **98**: 211–225.
- Rusakov DA, Davies HA, Harrisson E, Diana G, Richter-Levin G, Bliss TVP y Stewart MG. 1997. Ultrastructural synaptic correlates of spatial learning in rat hippocampus. *Neuroscience.* **80**: 69–77.
- Schmidt-Hieber C, Jonas P y Bischofberger J. 2004. Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature.* **429**: 184-187.
- Scoville WB y Milner B. 2000. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. 1957. *J. Neuropsychiatry Clin Neurosci.* **12**: 103 -113.
- Shetty AK y Turner DA. 1999. Aging impairs axonal sprouting response of dentate granule cells following target loss and partial deafferentation. *J Comp Neurol.* 414:238-254.
- Simic G, Kostovic I, Winbland B y Bogdanovic N. 1997. Volume and number of neurons of the human hippocampal formation in normal aging and Alzheimer's disease. *J. Comp. Neurol.* **379**: 482-494.
- Small SA, Chawla MK, Buonocore M, Rapp PR y Barnes CA. 2004. Imaging correlates of brain function in monkeys and rats isolates a hippocampal subregion differentially vulnerable to aging. *PNAS. USA.* **101**: 7181-7186.
- Spigelman I, Yan X-X, Obenaus A, Lee E. YS, Wasterlain CG y Ribak CH. 1998. Dentate granule cells form novel basal dendrites in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience.* **86**: 109–120.
- Squire L. 2004. Memory systems of the brain: a brief history and current perspectiva. *Review Neurobiol. Learn. Mem.* **82**: 171-177.
- Stewart MG, Davies HA, Sandi C, Kraev IV, Rogachevsky VV, Peddie CJ, Rodríguez JJ, Cordero MI, Donohue HS, Gabbott PL y Popov VI. 2005. Stress suppresses and learning induces plasticity in CA3 of rat hippocampus: a three-dimensional ultrastructural study of thorny excrescences and their postsynaptic densities. *Neuroscience.* **131**: 43-45.
- Vazdarjanova A, McNaughton BL, Barnes CA, Worley PF y 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.

- Vida I y Frotscher M. 2000. A hippocampal interneuron associated with mossy fiber system. *PNAS*. USA. **97**: 1275-1280.
- Walton ME, Bannerman DM y Rushworth FS. 2002. The role of rat medial frontal cortex in effort-based decision making. *J. Neurosci.* **22**: 10996-11003.
- Wang, H., Hu, Y. y Tsien, J. Z. 2006. Molecular and systems mechanisms of memory consolidation and storage. *Prog Neurobiol.* **79**: 123-135.
- Wang XY y Zhang JT. 2001. Effects of ginsenoside Rg1 on synaptic plasticity of freely moving rats and its mechanism of action. *Acta Pharmacol Sin.* **22**:657-662.
- West JR y Hodges-Savola CA. 1983 Permanent hippocampal mossy fiber hyperdevelopment following prenatal ethanol exposure. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* **5**: 139-150.
- Woolley CS. 2007. Acute effects of estrogen on neuronal physiology. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **47**: 657-680.
- Yang J, Hou C, Liu N, Shang Y, Zhou J, Xu L, y Li L. 2007. Enriched environment treatment restores impaired hippocampal synaptic plasticity and cognitive deficits induced by prenatal chronic stress. *Neurobiol. Learn Mem.* **87**:257-263.
- Zola-Morgan S, Squire LR, Clower RP y Rempel NL. 1993. Damage to the perirhinal cortex exacerbates memory impairment following lesions to the hippocampal formation. *J. Neurosci.* **13**: 251-265.

X. ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Corte horizontal de la formación hipocampal de la rata y sus divisiones.	6
Figura 2. Hipocampo y su ubicación en el cerebro de la rata.	7
Figura 3. Células de proyección que forman parte del intracircuito del hipocampo.	7
Figura 4. Circuito unidireccional del hipocampo de roedor.	8
Figura 5. A, Laberinto acuático de Morris (LAM) y B, laberinto radial de 8 brazos.	9
Figura 6. Regulación hormonal y por neurotransmisores de la plasticidad del hipocampo adulto.	13
Figura 7. Corte parasagital de cerebro de rata tratado con la técnica de Timm, en el SNC.	21
Figura 8. Esquema de los tres estadios de maduración de las fibras musgosas (FM) y una micrografía electrónica del complejo sináptico de las fibras musgosas.	22
Figura 9. Esquema de la entrada de las fibras musgosas (FM), hacia los estratos <i>lucidum</i> y <i>oriens</i> .	25
Figura 10. Esquema del laberinto de Morris con los cuatro puntos cardinales (norte N, sur, S, este E y oeste O).	30
Figura 11. Esquema de la vista dorsal del encéfalo, que muestra la región de análisis para el estudio histológico. En la fotografía se muestra el corte coronal del campo CA3.	32
Figura 12. El crecimiento progresivo de las FM, en animales control intacto (CI), por entrenamiento durante dos días (LAM2) y por sobreentrenamiento de dos mas días (LAM4) en el CA3.	33
Figura 13. Cortes coronales del hipocampo a 20X teñidos con Timm. En A, animal control y en B, animal sobre entrenado.	34
Figura 14. Promedio de latencias, entrenamiento 2 días (LAM2) y el promedio de los 10 ensayos por cada animal.	35
Figura 15. Promedio de latencias del sobreentrenamiento en 4 días (LAM4) con 10 ensayos por animal.	36

Figura 16. Comparación entre los días de prueba, que mostraron diferencias significativas a, con respecto al D1 y b, con respecto al D2. 37

Figura 17. Promedio de las áreas de los estratos *lucidum* y *oriens* respectivamente en mm². 39