



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

EFECTO DE LA ACTINOMICINA D EN LA TRANSCRIPCIÓN SOSTENIDA
DE ARC, EN LAS CÉLULAS GRANULARES DEL GIRO DENTADO

TESIS

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

PRESENTA

Alejandra Arafat Angulo Perkins

Director de Tesis: Dr. Víctor Ramírez Amaya

Campus Juriquilla, Querétaro, Noviembre 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Comité Tutorial certificamos que la tesis elaborada por: Alejandra Arafat Angulo Perkins, cuyo título es: “Efecto de la actinomicina D en la transcripción sostenida de Arc en las células granulares del giro dentado” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Presidente

Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera Lorenzo

Secretario (Tutor)

Dr. Víctor Ramírez Amaya

Vocal

Dr. Federico Bermúdez Rattoni

Suplente

Dr. Ataúlfo Martínez Torres

Suplente

Dra. Gina Lorena Quirarte

Aprobado por el Comité Académico

Coordinador del Programa

AGRADECIMIENTOS A:

Todos los integrantes del laboratorio A-13, en especial a Edgar, Jesús y Jimena.
Mi tutor, el Dr. Víctor Ramírez Amaya, por toda su ayuda, tiempo y paciencia; por enseñarme a persistir.
Itzel Ricaño, y Edgar Morales, por apoyarme reiteradamente para culminar el proyecto y por sus invaluable aportaciones a mi formación.
Cutberto Dorado por sus constantes implementaciones al laboratorio y por su buena disposición ante todo.

A la Dra. Gina Lorena Quirarte y a su equipo técnico, por permitirnos trabajar en su laboratorio y por apoyarnos repetidamente con instrumentos y equipo.

Mi comité académico, la Dra. Gina Lorena Quirarte y la Dra. Carmen Clapp, por sus contribuciones y por su ejemplo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
Becario No: 099016885
Por auspiciar el proyecto: Ref. 51028

Al PAPIIT, por auspiciar el proyecto: Ref. IN213907

Al personal del departamento de análisis de Imágenes Digitales
Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos

Al personal de la Biblioteca
M.V.Z. Román Pacheco Barrita
Lic. Ángel Salazar Muro
Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela

El personal del Bioterio
M.V.Z. Martín García Servín

Al personal de enseñanza
Dra. Teresa Morales Guzmán
M. en C. Leonor Casanova Rico
Yolanda Orduña Cruz

Con especial dedicación a mi hermosa abuela, Elena Carrera.

Dedicada a mis padres y mis hermanos, por su amor y apoyo incondicional.

A Rafo y Juan Carlos, con todo mi cariño, por siempre invitarme a hacer las cosas mejor y a seguir luchando por lo que quiero.

A mi Víctor, con todo mi corazón, por darme todo.

Y a todas las mujeres que me han apoyado en mi camino y que han sido mi mejor ejemplo: Kalina Perkins, Elena Carrera, Elena Angulo, Elvia Aguirre, Patricia Ramos y a la más incansable Danila Perkins.

...cambia todo cambia y así como todo cambia que yo cambie no es extraño...pero no cambia mi amor por más lejos que me encuentre... Mercedes Sosa.

RESUMEN

Dada la importancia que tiene el gen *Arc* para la plasticidad sináptica, es relevante caracterizar la dinámica de su expresión en el SNC. Se ha observado que en el giro dentado del hipocampo *Arc* se expresa de forma distinta que en otras regiones como los cuernos de Ammón y la corteza cerebral, lo que podría representar un mecanismo importante para los eventos plásticos que subyacen a la formación de la memoria y que dependen de esta estructura. Previamente, observamos la presencia de *Arc* (ARN nuclear y ARNm citoplasmático) en el giro dentado, manteniéndose hasta 8 horas después de haber inducido su expresión mediante la exploración de un ambiente novedoso. Encontrar el transcrito reciente de *Arc* (ARN nuclear), hasta 8 horas posterior a la exploración del ambiente, sugería que este gen se transcribe de forma sostenida. Sin embargo, para corroborar que la presencia sostenida de *Arc* se debe a un mecanismo dependiente de la transcripción, decidimos inhibirla utilizando la actinomicina D (inhibidor transcripcional), antes de la exploración y después de ella. Mediante esta estrategia farmacológica observamos que la actinomicina D impide el inicio de la transcripción por un periodo de 2 horas, cuando se administra previamente al estímulo; y si se administra después de la exploración del ambiente novedoso, abate la transcripción sostenida de *Arc* por un periodo de entre 2 y 8 horas. Lo anterior demuestra que después de la exploración de un ambiente novedoso se establece una transcripción sostenida de *Arc* en el giro dentado, aunque todavía queda por determinar si dicho mecanismo depende exclusivamente de eventos celulares o es regulado por actividad en la red neuronal.

SUMMARY

Given the relevance of the immediate early gene Arc in synaptic plasticity, it is important to describe the dynamic of its expression in the CNS. It has been observed that in the dentated gyrus the dynamic of Arc expression after exploration is different from that observed in other regions such as the Ammon's horns and the cerebral cortex. This could be of great relevance for the plastic mechanism underlying memory formation that depends upon the dentate gyrus.

After exploration Arc protein and mRNA can be detected in significantly more cells than those observed in control animals for more than 8 hours. By pinpointing the existence of intronic Arc within >50% of Arc expressing cells, an Arc sustained transcription phenomenon in the dentated gyrus after exploration of a new environment was suggested. However, to corroborate if this was indeed a mechanism dependent upon transcription, we decided to assess the effect of the transcriptional inhibitor actinomycin D in the behavioral induced Arc expression. By the administering actinomycin D intracerebroventricularly we were able to determine that the inhibitor effect of this drug last approximately 2 hours and if its administrated after the exploration of a new environment, blocks the prolonged expression of Arc, so in this conditions, eventhough Arc induction was allowed, Arc mRNA was no longer detected at 2 or 8 hours after exploration. This evidence confirm that after exploration of a new environment a sustained transcription of Arc is established in the dentated gyrus, however it is yet to be determined if such mechanism depends exclusively on cellular events or if it is regulated by activity in the neuronal network.

ÍNDICE

•	AGRADECIMIENTOS.....	II
•	RESUMEN.....	IV
•	SUMMARY.....	V
•	INTRODUCCIÓN.....	1
•	ANTECEDENTES.....	3
1.	Fenómenos de transformación del sistema nervioso.....	3
2.	La activación de <i>Arc</i> como mecanismo de transformación de la actividad neuronal.....	7
3.	Participación del giro dentado del hipocampo en la representación del ambiente y la formación de memoria.....	10
4.	La caracterización de la expresión de <i>Arc</i> en el giro dentado asociada a un evento conductual.....	14
•	JUSTIFICACIÓN.....	19
•	HIPÓTESIS.....	19
•	OBJETIVOS.....	20
•	ANIMALES, MATERIAL Y MÉTODOS.....	21
•	RESULTADOS.....	33
•	DISCUSIÓN.....	46
•	CONCLUSIONES.....	51
•	REFERENCIAS.....	53
•	ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	59
•	APÉNDICE.....	60

INTRODUCCIÓN

Una forma de aproximarse al estudio de los procesos cognoscitivos tales como la percepción, el lenguaje, el aprendizaje y la memoria, es mediante la construcción de planteamientos teóricos que intenten dilucidar los mecanismos mediante los cuales el sistema nervioso es capaz de interpretar la información, de manejarla o bien de almacenarla. En lo que refiere a la memoria, existen planteamientos teóricos como los realizados por Hebb (1949), en los cuales se ha propuesto que la formación de memorias depende del establecimiento de cambios plásticos en la comunicación de las células nerviosas. Estas modificaciones en la conectividad (cambios plásticos) serían necesarias para mantener a largo plazo la funcionalidad de la red de neuronas que fueron activadas y que estarían representando la información mediante sus patrones de actividad.

Una manera de aproximarnos experimentalmente al problema de la formación de memoria, es estudiando los eventos que ocurren dentro de la célula y que dan lugar a los cambios plásticos.

Entre los eventos celulares importantes para la plasticidad sináptica, se encuentran la transcripción de genes y la expresión de proteínas. Se sugiere que estos mecanismos permiten la consolidación de la información en memorias, a través de modificaciones en las neuronas que conforman la red (grupo de células activadas) (Kelleher, Govindarajan y Tonegawa. 2001). Se ha demostrado que uno de los genes importantes para la plasticidad sináptica es el gen efector inmediato *Arc*, el cual parece tener un papel importante en el escalamiento sináptico y posiblemente regule la plasticidad estructural (Bramham, Worley, Moore y Guzowski. 2008; Plath et al. 2006). Por lo anterior, es de suma importancia estudiar la dinámica de la expresión de *Arc*, para poder explicar parte de los mecanismos que subyacen a los cambios plásticos, en las sinapsis de las células que formaran parte de los ensambles de la memoria a largo plazo (Bramham y Messaoudi, 2005).

Previamente, se había demostrado que la dinámica de expresión de *Arc* después de la experiencia de exploración de un ambiente novedoso, es diferente entre las células

piramidales de los cuernos de Ammón y la corteza cerebral, comparado con las células granulares del giro dentado (Ramirez-Amaya et al. 2005). En el giro dentado el transcrito reciente de *Arc* se ha encontrado en las neuronas activadas por la experiencia espacial novedosa hasta por 8 horas (Ramirez-Amaya et al. 2005; Chawla et al. 2005). Resultados previos realizados durante mi tesis de licenciatura, sugerían que esta dinámica de expresión pudiera depender de un mecanismo de transcripción sostenida, lo cual quisimos corroborar mediante la inhibición farmacológica de la transcripción con el uso de actinomicina D.

Nuestro modelo experimental implicó la exploración de un ambiente novedoso (utilizando ratas de la cepa Wistar), el uso de microcirugía de canulación para la administración intraventricular de la actinomicina D, y finalmente, el uso de “catFISH” (análisis compartamental de la actividad neuronal temporal mediante el uso de hibridación *in situ* fluorescente) para la identificación histológica de actividad celular (expresión de *Arc*). Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue afectar la transcripción del gen efector inmediato *Arc*, para determinar si el mecanismo celular que posibilita que este gen permanezca transcribiéndose hasta por 8 horas es efectivamente la transcripción sostenida. Lo importante de este trabajo es que podremos determinar si se trata o no de un mecanismo dependiente de la transcripción y contribuiremos con evidencia que nos ayude a determinar si estos mecanismos dependen de eventos celulares o de otros dependientes de la red neuronal.

ANTECEDENTES

1. Fenómenos de transformación del sistema nervioso

En 1972 Barlow planteó una idea: *“El pensamiento se construye por medio de la actividad de las neuronas y no deberíamos utilizar frases como: la actividad neuronal refleja o monitorea los procesos de pensamiento. Porque la actividad de las neuronas simplemente es en sí misma el proceso de pensamiento.”* La idea que planteó Barlow nos habla de un problema que fue discutido de manera amplia por mucho tiempo; actualmente la tendencia es entender la actividad y el metabolismo neuronal antes de trasladarlo a su manifestación como proceso cognitivo.

Seguido a este planteamiento existen diferentes aproximaciones que se han dedicado a contribuir a la caracterización de cómo el sistema nervioso, y de manera particular las neuronas, regulan sus diferentes procesos metabólicos como resultado de la constante interacción con el medio externo y con las continuas variables endógenas que pueden alterarse, y así transformar el estado homeostático del organismo en general.

Que el sistema nervioso tenga la posibilidad de modular sus dinámicas como resultado de interacciones endógenas y exógenas, le otorga cierta característica de plasticidad que le permite contender con las constantes modificaciones del medio y por ende lo actualiza permanentemente del estado externo y del interno. Sin embargo, se debe mencionar que aunque el sistema nervioso, dentro de los límites que lo definen, detecta las modificaciones en las variables de información que puede ingresar o censar, no todas éstas han de transformarlo de manera más duradera. En la idea anterior se plasma la pregunta implícita de cómo el sistema nervioso podría hacer duradera una experiencia conductual o una condición fisiológica interna, por poner ejemplos.

Una de las propuestas que intentan dar una explicación a esta pregunta, y que posiblemente Barlow conocía, fue la planteada por Donald Hebb en 1949. En su propuesta, Hebb planteó que el sistema nervioso procesa y codifica la información a

través de los patrones de actividad eléctrica de grupos de neuronas, estos grupos de neuronas con actividad sincrónica, que denominó ensambles neuronales, serían la representación de dicha información. El que Hebb hable de grupos de neuronas como la unidad mínima de procesamiento de información, no desdeña los eventos a nivel individual. Estas modificaciones en cada unidad neuronal que integra el ensamble, como resultado de la experiencia, han de ser muy finas y pueden llegar a modificar el patrón de actividad eléctrica de una neurona de manera no transitoria. Hebb planteó su postulado de la siguiente forma: *“Cuando el axón de una célula A está lo bastante cercano a una célula B como para excitarla y repetida o persistentemente la excita, tiene lugar algún proceso de crecimiento o cambio metabólico en una o ambas células, de modo tal que la eficiencia de A, como una de las diversas células que hace disparar a B, aumenta.”*(Hebb, 1949). Esta fue la primera propuesta explícita de que los cambios en la eficiencia sináptica son el mecanismo que permite estabilizar la respuesta de los ensambles, para permitir el establecimiento de los patrones de actividad a largo plazo y así consolidar la información, es decir, formar una memoria.

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

Se han descrito diferentes eventos de actividad neuronal que desencadenan modificaciones duraderas en las conexiones de las células nerviosas, uno de éstos es la actividad que se presenta como resultado de la activación de receptores a glutamato (Kandel, Schwartz y Jessell. 2001). De manera particular, algunos de los receptores ionotrópicos a glutamato como los AMPA (ácido propiónico α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol) y principalmente los NMDA (N-metil d-aspartato), se han relacionado con

formas tempranas de plasticidad y que pueden desencadenar mecanismos moleculares que modifiquen la comunicación sináptica a largo plazo (Ramírez-Amaya, 2007).

En la Figura 1 se muestran algunos de los eventos moleculares que pueden ocurrir como consecuencia de la activación de receptores a NMDA. Con la activación de los receptores a glutamato tipo NMDA se permite la entrada de Ca^{2+} dando lugar a la activación de diferentes cinasas como la cinasa tipo II dependiente de calcio y calmodulina (CaMKII), cinasa C de proteínas (PKC), éstas al activarse pueden fosforilar diferentes proteínas de membrana, entre las que se incluyen los receptores AMPA y NMDA, que al estar fosforilados modifican sus características funcionales y permiten modificar la eficiencia de la respuesta post-sináptica. Algunas de estas cinasas pueden activar enzimas como la sintasa del óxido nítrico (NO), la cual funciona como mensajero retrógrado que modifica la liberación de neurotransmisor. Todos estos eventos dan lugar a modificaciones plásticas tempranas que tienden a ser transitorias. Los eventos plásticos tardíos, aunque también son regulados por las señales de calcio, pueden influir sobre la transcripción de genes ya sea por sí mismos (Fields, Lee y Cohen. 2005) o, por medio de la activación de otros sistemas como el AMP cíclico, que es producto de la actividad de la adenilato ciclasa, la cual funciona como un importante segundo mensajero cuya actividad regula a otras cinasas como la PKA (cinasa A de proteínas). De esta forma puede regularse la transcripción de genes mediante la activación de factores de transcripción como CREB (proteína de unión responsiva a AMPc) el cual es reconocido como uno de los factores plásticos más relevantes, pues regula la transcripción de diversos genes (Kandel, Schwartz y Jessell. 2001).

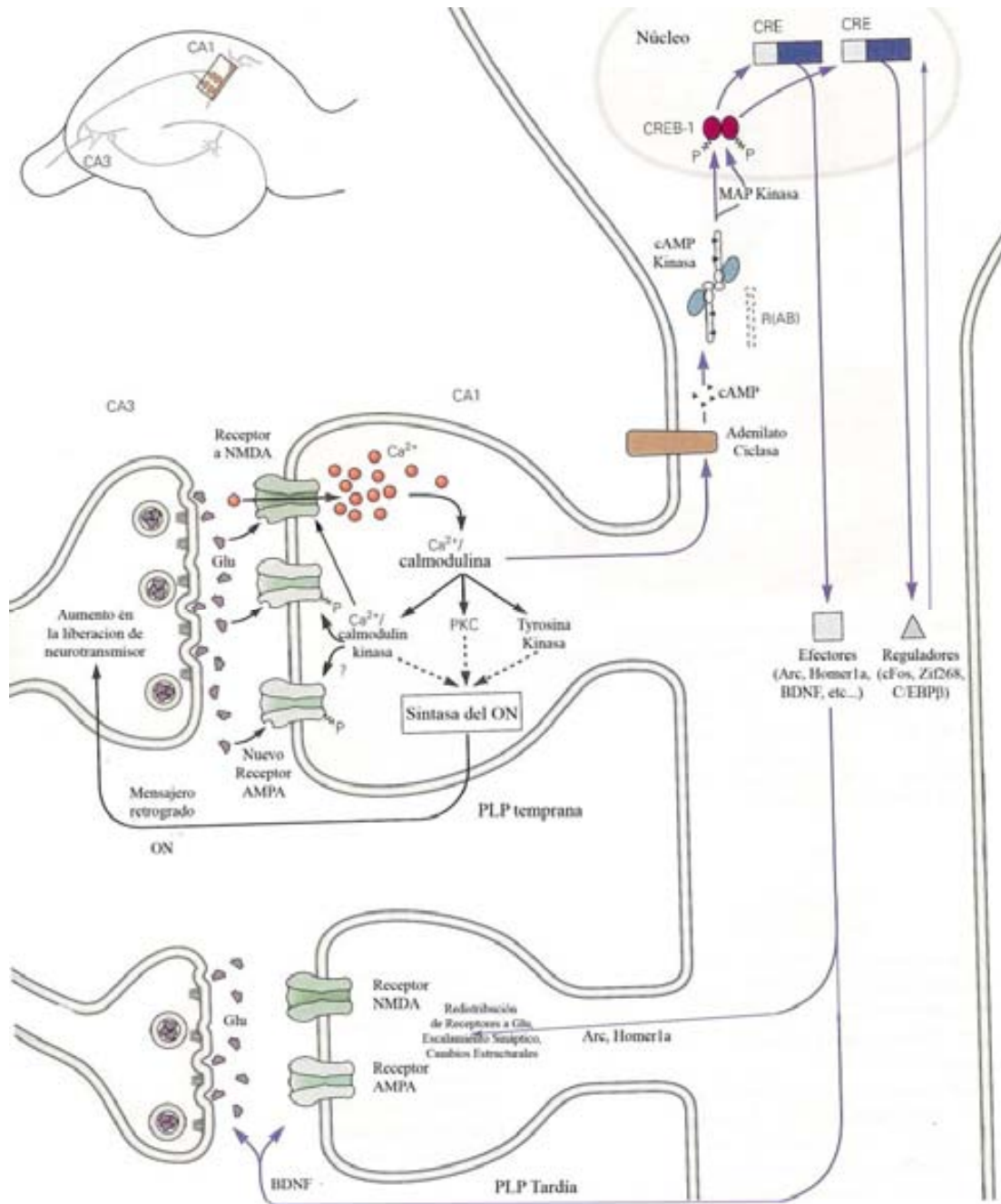


Figura 1. Se representan los eventos moleculares que subyacen los cambios plásticos tempranos y los tardíos (Modificado de Kandel et al. 2001).

El estudio de la activación de genes de expresión inmediata como mecanismo molecular que puede dar lugar a los procesos plásticos tardíos, es el centro de nuestro trabajo.

2. La activación de *Arc* como mecanismo de transformación de la actividad neuronal

En las últimas décadas se han identificado una serie de genes cuya expresión se induce con actividad neuronal e independientemente de la síntesis de nuevas proteínas. A estos genes se les denomina **genes inmediatos de expresión temprana**. Se les considera genes inmediatos porque su transcripción es independiente de la síntesis de nuevas proteínas, de esta manera, todos los genes cuya expresión se induce aun en presencia de inhibidores de la síntesis de proteínas como cicloheximida o anisomicina, son considerados genes de expresión inmediata (Worley et al. 1990). También se les considera de expresión temprana porque se inducen rápidamente después de un episodio de actividad neuronal. Esta actividad neuronal puede generarse experimentalmente mediante estimulación eléctrica, como lo es la estimulación eléctrica máxima, la cual induce convulsiones (MECS o maximal electroconvulsive shock). De esta manera, típicamente se caracterizan los genes inmediatos de expresión temprana estimulando el SNC con MECS e inhibiendo la síntesis de proteínas con cicloheximida o anisomicina (Lanahan y Worley, 1998).

Por lo anterior, a los genes como *cFos*, *cJun*, *Zif268*, *Arc* y *Homer 1a* (Lanahan y Worley, 1998) se les ha denominado genes inmediatos de expresión temprana. Dentro de este grupo de genes se distinguen dos grandes familias: los **genes efectores**, los cuales tienen un efecto directo en el maquinaria celular en la que inciden, como es el caso de *Homer 1a* y a *Arc*. *Homer 1a* está asociado a la agrupación de receptores en la membrana postsináptica y *Arc* con la endocitosis de receptores postsinápticos, estos efectos son directamente regulados por sus proteínas. La otra familia incluye a los **genes de regulación transcripcional**, como *c-Fos*, *c-Jun* y *Zif268*, en cuyo caso, su función está relacionada con la regulación de la expresión de otros genes (Lyford et al. 1995).

Las características de la expresión de estos genes, han permitido el desarrollo de métodos de imagenología como lo es “catFISH” (por sus siglas en ingles) o análisis compartamental de la actividad neuronal temporal, mediante el uso de hibridación *in situ* fluorescente. Con esta técnica podemos identificar células activadas por un evento

conductual, con una resolución temporal en el orden de minutos y una resolución anatómica a un nivel celular preciso.

Actualmente se conoce la cinética de expresión de varios de estos genes. En la Figura 2 se ejemplifica la información temporal que la técnica brinda. En el recuadro **a**, se puede distinguir el transcrito reciente del gen *Arc*, que se observa como dos puntos (marcados en rojo) dentro del núcleo celular (marcado en azul), esta primera expresión tiene una ventana temporal de 5 minutos. A los 30 minutos (cuadrante **b**), podemos observar el transcrito tardío, es decir, el ARNm de *Arc* situado en el citoplasma, en la figura se aprecia como una mancha roja alrededor del núcleo (coloreado en azul). Por lo anterior, en el cuadrante **c**, la célula se activó hace 30 por la señal en rojo del ARNm de *Arc*, la cual rodea el núcleo; pero también podemos saber que se reactivó hace sólo 5 minutos, puesto que también presenta las marcas del transcrito reciente (dos puntos dentro del núcleo) (Link et al. 1995; Lyford et al. 1995). Si empleamos esta técnica con dos genes de expresión inmediata, que tengan cinéticas de expresión distintas, podemos obtener dos marcas temporales, las cuales indican el momento en el que esa neurona se activó según. En el caso del cuadrante **d**, se identifica el transcrito temprano de *Arc* (los puntos en color rojo) a los 5 minutos y el transcrito temprano de *Homer 1a* (dos puntos en color verde) que se expresa a los 30 minutos.

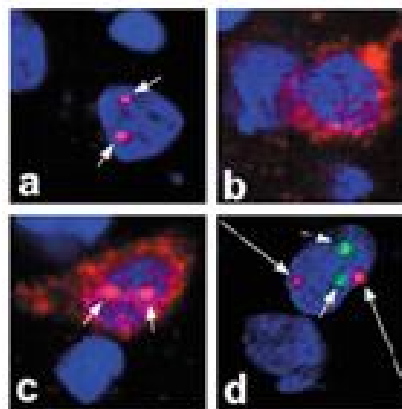


Figura 2. Fotografía con microscopio confocal a 63x. Hibridación *in situ* fluorescente para *Arc* (en rojo) y *Homer1a* (en verde); el núcleo de las células está teñido con DAPI (azul). La presencia temprana de *Arc* en el núcleo (a) se indujo aproximadamente 5 minutos antes, mientras que la presencia tardía de *Arc* en el citoplasma (b), se debe a la actividad que ocurrió 30 minutos antes. La superposición de *Arc* en el núcleo y en el citoplasma (c), se debe a que la célula se activó en ambas ocasiones. La superposición de *Arc* y *Homer1a* en el núcleo (d) (Modificado de Guzowski, McNaughton, Barnes y Worley. 1999).

En este trabajo utilizamos el gen *Arc* ó *Arg 3.1* (proteína asociada al citoesqueleto regulada por actividad). Precisamente, fue la identificación de la expresión de *Arc*, mediante hibridación *in situ* fluorescente, y las características de inducción de su expresión (Link et al. 1995; Lyford et al. 1995), las sirvieron para desarrollar la técnica de “catFISH” (Guzowski et al. 1999). Se ha encontrado que células en el hipocampo y la corteza, que presentan actividad neuronal de alta frecuencia durante un evento conductual, inducen la expresión de *Arc*. Por otro lado, se sabe que la inducción de la expresión de *Arc* es dependiente de la actividad de receptores a NMDA y de la entrada de calcio al interior de la célula (Steward y Worley, 2002; Zheng, Luo y Wang. 2009). Recientemente se ha caracterizado el promotor y el “enhancer” de *Arc*, los cuales son secuencias que permiten que este gen o un reportero se induzcan en respuesta específica a la actividad sináptica (Kawashima et al. 2009). Así mismo, el promotor de *Arc* depende de la entrada de calcio y de la activación de MAPK (cinasa de proteínas activada por mitógenos) ([Waltereit et al. 2001](#)).

Se ha descrito que el ARNm de *Arc* se traslada a las regiones dendríticas que fueron activadas (Steward, Wallace, Lyford y Worley. 1998), donde puede ser traducido localmente (Steward y Schuman, 2003; Steward y Worley, 2001). En otros trabajos se ha bloqueado la traducción de *Arc* con oligos antisentido y se ha visto que eso afecta el mantenimiento de la potenciación a largo plazo (PLP) (Bramham y Messaoudi, 2005; Guzowski et al. 2000). Lo anterior resulta muy relevante para la plasticidad sináptica, puesto que la PLP es uno de los modelos principales propuestos de plasticidad sináptica, el cual implica un aumento estable y duradero en la magnitud de la respuesta post-sináptica (Bliss y Lomo, 1973).

Recientemente se ha demostrado que la proteína de *Arc* interactúa con endofilina y dinamina en las dendritas, induciendo la endocitosis de receptores AMPA (Shepherd et al. 2006). Se sugiere que de esta forma *Arc* participa en mecanismos de escalamiento sináptico (el escalamiento sináptico es un mecanismo que permite regular a la baja, la actividad general de una red para hacer más conspicuos los puntos particulares donde ocurrió la actividad) que subyacen a la depresión a largo plazo (DLP), la cual implica

una disminución, estable y duradera, en la magnitud de la respuesta post-sináptica (Bramham et al. 2008). De manera particular, se sugiere que la traducción de *Arc* en las dendritas facilita la expansión de la F-actina, y con ello participaría en la consolidación de la PLP (Bramham et al. 2008).

La secuencia de *Arc* presenta una alta homología con espectrina y co-precipita con F-actina (Lyford et al. 1995). Dichas moléculas son importantes proteínas del citoesqueleto. En el neuroblastoma *Arc* induce el crecimiento de neuritas cuando interactúa con la cinasa CAMKII (cinasa tipo II dependiente de calcio y calmodulina) (Donai et al. 2003). Se ha demostrado que *Arc* sólo se expresa en células CAMKII positivas (Vazdarjanova et al. 2006), por lo que se ha sugerido que CAMKII es una importante molécula que acompaña a *Arc* en distintas funciones plásticas. *Arc* interactúa con la CAMKII exclusivamente en las dendritas, en donde al parecer inhibe la actividad de CAMKIIb y promueve escalamiento sináptico mediante la endocitosis de receptores AMPA. Sin embargo, en las espinas activadas *Arc* no interactúa con CAMKIIb, permitiéndole promover cambios estructurales.

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

3. Participación del hipocampo en la representación del ambiente

La formación hipocampal está localizada en el cuerno inferior de cada ventrículo lateral y consta de tres regiones: el hipocampo (dividido generalmente en tres áreas llamadas cuernos de Ammón 1, 2 y 3, abreviados normalmente como CA1, CA2 y CA3), el giro dentado (GD), y el subíulum.

El giro dentado fue caracterizado anatómicamente por Ramón y Cajal (1893), que describió una banda exterior o superior y una banda interior o inferior. Él también identificó siete láminas en el hipocampo, pero actualmente se consideran principalmente tres diferentes estratos: stratum molecular (también llamado stratum lucidum), el estrato de células piramidales y el stratum oriens (también denominado capa polimórfica) (Figura 3). La población neuronal en el hipocampo incluye a las células piramidales (que son las neuronas principales de los cuernos de Ammón), las células granulares (que son las neuronas principales del giro dentado), las intrínsecas (células polimórficas, células de canasta), interneuronas gabaérgicas y a las células musgosas.

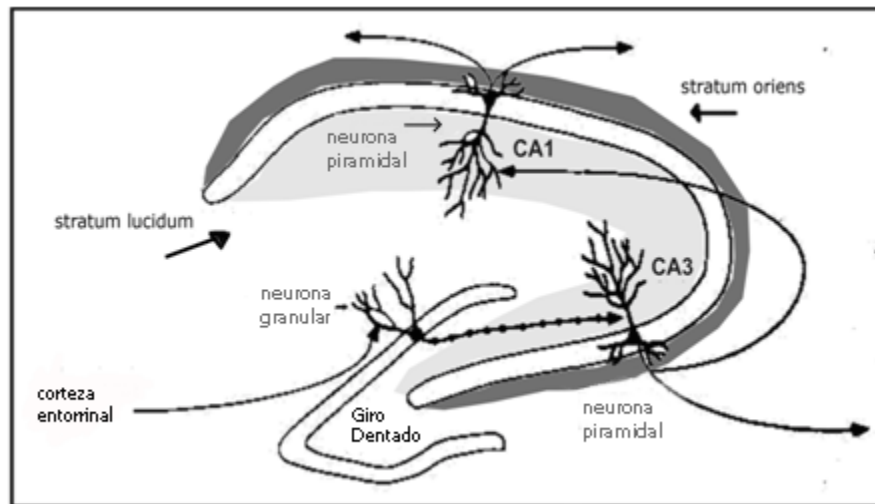


Figura 3. Representación de la organización estructural del GD, CA1 y CA3 en la formación hipocampal y de las conexiones del circuito tri-sináptico. Las células granulares del GD reciben proyecciones de la corteza entorrinal, éstas se proyectan vía fibras musgosas a las células piramidales del CA3, para posteriormente proyectarse a las células piramidales del CA1. En color gris claro se observa el stratum lucidum o capa molecular, y en gris oscuro, el stratum oriens o capa polimórfica (Modificado de Gazzaniga, 2000).

El hipocampo se ha descrito como una región altamente plástica, en ella se demostró la ocurrencia de la PLP (Bliss y Lomo, 1973). También se ha demostrado la ocurrencia de plasticidad estructural después de manipulaciones experimentales como la inducción de epilepsia (Cavazos y Sutula, 1990), estimulación que induce la PLP (Escobar, 1999) y después del sobre-entrenamiento en una tarea de laberinto de agua (Ramirez-Amaya, Escobar, Chao y Bermudez-Rattoni. 1999; Ramirez-Amaya et al. 2001). En estos estudios

se ha reportado el incremento en el número de contactos sinápticos de las fibras musgosas. Además se ha demostrado un incremento en el número de dendritas en las células piramidales, en animales que habitan en ambientes complejos (Moser, Trommald y Andersen. 1994), condición que les permite ejecutar mejor las tareas espaciales. Finalmente, otras investigaciones han demostrado que en el hipocampo, particularmente en el giro dentado (GD), se generan nuevas neuronas en el animal adulto (Abrous, Koehl y Le Moal. 2005), las cuales también podrían ser relevantes para la memoria (Shors et al. 2001).

Dadas las características plásticas de esta estructura, no es difícil entender por qué tiene un papel preponderante en la formación de la memoria. Hoy en día, se tiene claro que el hipocampo está relacionado con la formación de memoria explícita, es decir, con el almacenamiento de la información que puede declararse (Barco, Bailey y Kandel. 2006). Este tipo de memoria implica todo nuestro bagaje semántico (denominada memoria semántica); y también dentro de esta categoría de memoria explícita está la variante que refiere al almacenamiento de eventos (esta refiere a las representaciones en tiempo y espacio de un suceso) (Squire y Cave, 1991). Por lo que se plantea que la memoria semántica va agregando información de significados a los eventos definidos en espacio y temporales (Moscovitch, Nadel, Winocur, Gilboa y Rosenbaum. 2006). Con relación a lo anterior, la propuesta es que el papel del hipocampo es formar y almacenar memorias episódicas (información de lugar y tiempo de un evento) y contribuir a la formación de memoria semántica (bagaje semántico), la cual se sugiere que se almacena principalmente en la corteza.

Dentro de la memoria episódica, se ha incluido un tipo de memoria denominada espacial, que incluye la información que es necesaria para construir la representación de un evento que se da en determinado momento y lugar. Uno de los descubrimientos que corroboran la participación del hipocampo en la ejecución de tareas espaciales fue realizado por O'Keefe y Dostrovsky (1971). Ellos demostraron que existen neuronas en el hipocampo que se activan específicamente cuando el animal está en una localización determinada en el ambiente. A estas células se les llamó células de lugar, las cuales se consideran como

aquellas que presentan un incremento en su tasa de disparo en respuesta a un lugar específico del espacio (Figura 4). Las células que presentan características de disparo de células de lugar, son todas las células piramidales de las regiones del CA1, CA2, CA3 y las granulares del GD (en el subículum también se han encontrado células que responden principalmente a cambios en la dirección de la cabeza; y en la corteza entorrinal se encontraron células con múltiples campos receptivos espaciales). Las células de lugar, presentan un patrón de encendido que parece ser producto de la interacción del organismo con su medio, es decir, con el espacio en el que se encuentre en dicho momento. Los estudios sugieren que las células que presentan campos receptivos espaciales (en inglés “place field”), al responder en conjunto, representan el contexto (generando un mapa espacial). Lo que ya había sido sugerido por Tolman (1948) y por O’Keefe y Nadel (1978).

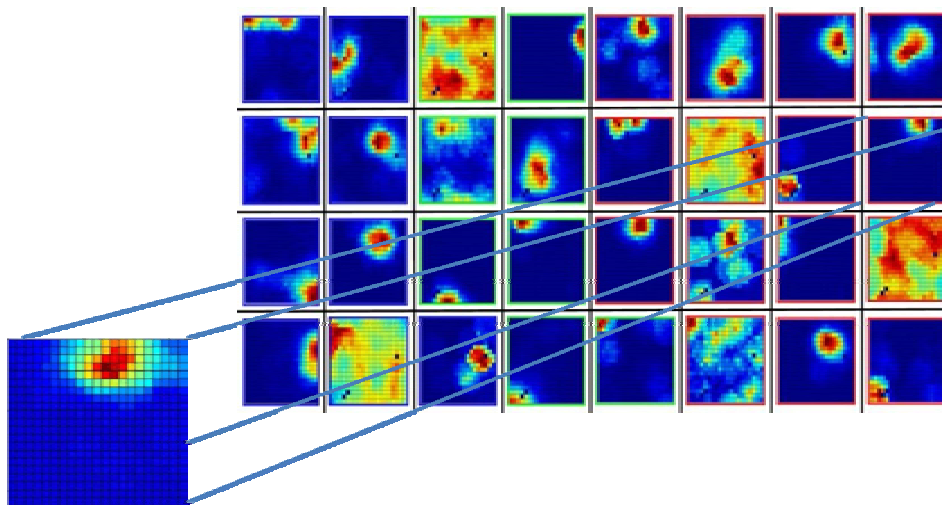


Figura 4. Esquema colorimétrico utilizado para el realizar los mapas de tasa de disparo de distintas neuronas en un ambiente de exploración. Los gradientes de coloración del azul (mínima tasa de disparo) al rojo (máxima tasa de disparo), permiten identificar los campos receptivos espaciales a los que una célula responde aumentando su tasa de disparo. Cada cuadrícula representa el ambiente de exploración. En este esquema se pueden identificar células que responden de manera generalizada (cuadros totalmente coloreados en rojo o naranja) a cualquier parte del espacio y otras que lo hacen de manera selectiva (cuadros con sólo una región coloreada en rojo) a un espacio restringido del ambiente (modificado de [O'Keefe , 1999](#)).

Para concluir esta parte, cabe mencionar que en la región del CA1, aproximadamente el 40% de las células se caracterizan como células de lugar y presentan lo que se denomina campo receptivo espacial (“place field”). Lo anterior significa que el 40% de las células piramidales del CA1 responden a un lugar específico en el espacio durante la tarea exploratoria (Guzowski, McNaughton, Barnes y Worley. 1999). Esa proporción de

células que presentan actividad electrofisiológica de células de lugar en un ambiente determinado, expresa *Arc* en las mismas condiciones conductuales. Esto es, el 40% de las células en CA1, el 20% en CA3 y el 50% en la corteza parietal, expresan *Arc* a consecuencia de la exploración ambiental (Vazdarjanova, McNaughton, Barnes, Worley y Guzowski. 2002; Ramírez-Amaya, et al. 2005).

4. La caracterización de la expresión de *Arc* en el giro dentado asociada a un evento conductual

Como se mencionó previamente, la expresión de *Arc* en el hipocampo se ha correlacionado con la actividad electrofisiológica en respuesta a una exploración espacial. Sin embargo, la expresión de *Arc* varía según la región. En los cuernos de Ammón (CAs) y la corteza parietal, donde existen principalmente células piramidales, el pico de expresión de la proteína de *Arc* se da aproximadamente 1 hora después de la exploración, y regresa a un estado basal a las 3 horas. En estas regiones se ha observado una reactivación parcial del ensamble original 8 horas después de la exploración, lo cual implica que algunas de las células, originalmente activadas, inician una nueva expresión de *Arc* en un tiempo fuera de línea (Ramírez-Amaya et al. 2005). Este evento pudiera ser de gran importancia para la consolidación de la memoria a largo plazo, cuya función podría ser la de propiciar modificaciones en las conexiones sinápticas en un ensamble neuronal reducido. El principio de escasez de la respuesta, sugiere que entre menos sean las células que integren el ensamble que represente a un evento, será mayor la capacidad del sistema para almacenar información (McNaughton et al. 1996; Sakurai, 1999).

En el giro dentado sucede algo particular, la expresión de *Arc* es considerablemente menor, sólo un 1.7% de células granulares lo expresan a consecuencia de la exploración (Chawla et al. 2005; Ramirez-Amaya et al. 2005). Este dato contrasta con la expresión de 40% en CA1, de 20% en CA3 y de 50% en la corteza parietal (Ramírez-Amaya et al. 2005; Vazdarjanova et al. 2002). Lo anterior podría implicar que el principio de escasez en esta región hipocampal, se cumple desde la primera respuesta a la estimulación y sugeriría que la capacidad mnémica del giro dentado pudiera ser muy alta.

Es importante notar que tanto el ARNm como la proteína de *Arc* mantienen su expresión por encima de niveles basales durante un periodo de al menos 8 horas, posteriores a la exploración inicial (Figura 5) (Ramírez-Amaya et al. 2005).

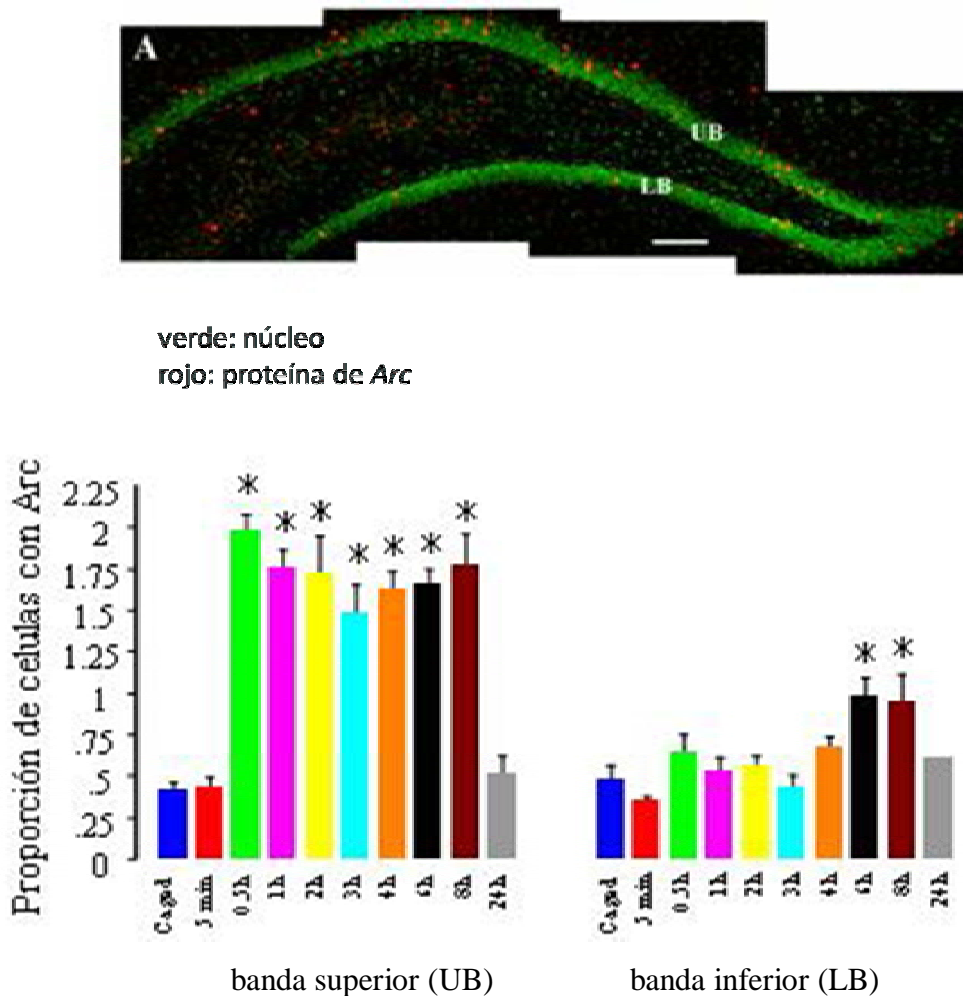


Figura 5. En A, reconstrucción de la banda superior (UB) e inferior (LB) de un giro dentado (hipocampo izquierdo), realizada con microscopio confocal a 40x. En rojo (marcadas con Cy3) se observan las células que expresan *Arc*, en verde esta la tinción nuclear con SYTOX. La expresión de *Arc* se observa principalmente en la banda superior (UB) del giro dentado. Las gráficas de barras muestran la expresión de la proteína de *Arc* en el giro dentado generada por la exploración espacial; desde los 30 minutos después de la exploración, la proteína de *Arc* está presente en una proporción aproximada del 2%, con relación al total calculado de células granulares, y la proporción de células que expresan *Arc* se mantiene significativamente elevada, con respecto a los controles, hasta 8 horas después de la exploración, regresando a niveles basales a las 24 horas. * $p < 0.01$ (modificado de Ramírez-Amaya et al. 2005).

Sin embargo, cabe mencionar que los resultados anteriores se obtuvieron con un modelo experimental en el que se trabajó con ratas que fueron sometidas a un programa particular de exploración. En ese programa la rata exploró una caja durante cinco minutos, y se le situó en diferentes cuadrantes de manera aleatoria para garantizar que

durante ese tiempo explorara todo el ambiente; posteriormente se les colocaba en su caja habitación por un intervalo de tiempo determinado, el cual fue diferente para cada grupo experimental (0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8 y 24 horas). Después de que transcurrió el intervalo, los animales eran sometidos nuevamente a la condición de exploración en el mismo ambiente; al final de la segunda exploración se sacrificaron inmediatamente. Los cerebros de los animales fueron seccionados (hipocampo izquierdo) y posteriormente sometidos a un tratamiento de inmunohistoquímica y de hibridación *in situ* para detectar la presencia de la proteína de *Arc* y su ARNm. Se utilizó microscopía confocal para capturar las imágenes (regiones del CA1, CA3 y del GD), que posteriormente fueron analizadas y finalmente, con un tratamiento estadístico se obtuvo una caracterización de la expresión de *Arc*.

Los datos más interesantes que arrojó este trabajo se pueden resumir en lo siguiente: después de una conducta exploratoria las células piramidales del CA1, CA3 y la corteza parietal expresaron la proteína *Arc* desde los 30 minutos después de la exploración; 3 horas después la proporción de células con *Arc* estaba en niveles basales; en el punto temporal de 1 hora, las células que expresaron la proteína *Arc* igualaron a la proporción de células que expresaron el ARNm, este último en respuesta a la segunda exploración. Sorprendentemente, a las 8 y 24 horas, un subgrupo de las neuronas piramidales del CA1, CA3 y la corteza parietal, de las originalmente activadas por la conducta exploratoria, presentó una reactivación de la expresión de la proteína de *Arc*.

En el GD las células granulares respondieron a la exploración en una proporción de $\pm 2\%$, lo que representa un orden de magnitud por debajo de la proporción observada en las regiones de células piramidales (20% en CA3 y 40% en CA1) que expresaron *Arc* en respuesta a la misma conducta. Además, la expresión de *Arc* en el citoplasma se observó desde los 30 minutos y se mantuvo estable al menos por ocho horas.

Un punto que se debe destacar es que los animales fueron sometidos a dos exploraciones, por ello es difícil saber porqué el ARNm de *Arc* y su proteína permanecen por un periodo de 8 horas arriba de sus niveles basales, pues no se puede distinguir si la respuesta prolongada se debió a la primera exploración o la segunda.

Una manera en la que se resolvió este problema fue diseñando una estrategia experimental que implicara una sola exploración, con el propósito de caracterizar la presencia sostenida de *Arc* en el giro dentado; y así identificar si se trata de un solo evento transcripcional o de muchos a través del tiempo. Para resolver el problema de la caracterización temporal de *Arc*, se sintetizó la sonda del ARN utilizando un templado de ADN, y se utilizaron plásmidos que contenían secuencias de ADN, que detectan el ARNm y el intrón (el ARN en el núcleo que contiene los intrones y los exones) de manera independiente. Con la metodología descrita se pudo garantizar la presencia temprana del transcrito de *Arc* en el núcleo (como dos focos de expresión, que representan los dos alelos del gen), y así pudimos distinguirla de la presencia de *Arc* en el citoplasma de la célula, la cual sabemos ocurre después de 30 minutos (Vazdarjanova, McNaughton, Barnes, Worley y Guzowski. 2002). Como resultado se identificaron a las células que expresaron tanto el intrón (en el núcleo, como transcripción reciente) como la sonda completa de *Arc* (en el citoplasma, como la transcripción tardía); también se cuantificaron los marcajes individuales (nucleico y citoplasmático) por separado (Figura 6). Finalmente, se analizaron los tejidos de los diferentes grupos experimentales (5, 30, 120, 360, 480, 720 y 1440 minutos), para determinar si las células granulares presentan, o no, transcripción de *Arc* a lo largo del tiempo y cuánto tiempo dura este evento. Con este experimento se sugirieron dos posibilidades del porque *Arc* se mantiene por un periodo tan largo en las células granulares después de la exploración: a) El ARNm de *Arc* tiene una vida larga en el GD a diferencia de las otras estructuras en donde se degrada rápidamente; o, b) El ARNm de *Arc* se transcribe de manera continua o sostenida por 8 horas.

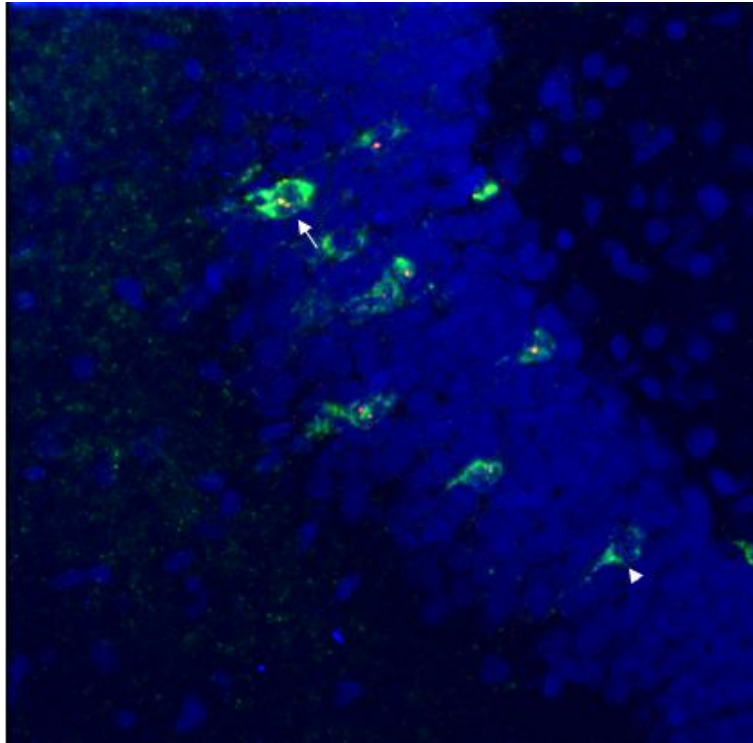


Figura 6. Fotografía con microscopio confocal a 40x. Sección de un giro dentado perteneciente a una rata que exploró una sola vez por 5 minutos y se sacrificó 30 minutos después. El núcleo de las células se aprecia en color azul, marcado con TO-PRO-3; la detección de *Arc*, tanto en el ARNm en el citoplasma como en el núcleo, se observa de color verde, y la sonda del intrón de *Arc* se observa como dos puntos rojos en el núcleo (se observan regularmente en color amarillo debido a la co-localización del intrón de *Arc* y de la sonda completa). Las células que expresan *Arc* en el citoplasma y en el núcleo (como la célula que muestra la flecha) se clasifican como *Arc* doble. Pocas células muestran sólo tinción citoplásmica (ver cabeza de flecha) y son clasificadas como *Arc* citoplásmico.

Los 3 resultados principales que se encontraron en el giro dentado, después de una sola conducta exploratoria, fueron: 1) aproximadamente 2% de las neuronas expresan *Arc* (lo que coincide con los trabajos previos), de esa población al menos el 50% de las células que expresaron *Arc* presentan tanto el intrón del ARN de *Arc* (en el núcleo), como el ARNm maduro (en el citoplasma). 2) el porcentaje de actividad se mantuvo en los grupos de 5, 30, 120, 360 y 480 minutos, mientras que para los grupos de 720 y 1440 minutos el porcentaje de actividad era parecido al de los controles. 3) en todos los grupos experimentales se encontró población neuronal que expresaba *Arc* en el núcleo, por lo que se sugería fuertemente que este gen se transcribe de manera constante en estas células.

JUSTIFICACIÓN

La intención de la presente tesis fue generar una estrategia que nos permitiera corroborar nuestros resultados previos, que sugieren que la razón por la cual en el giro dentado *Arc* se mantiene transcribiéndose por más de 8 horas después de la exploración espacial, se debe a un mecanismo celular de transcripción sostenida. Dicha estrategia consistió en el uso de un inhibidor de la transcripción, la actinomicina D, que es un antibiótico polipeptídico, aislado de bacterias de suelo, del género *Streptomyces*. La actinomicina D ha sido utilizada principalmente como herramienta de investigación en biología celular para inhibir la transcripción. Esta inhibición la logra uniéndose al ADN en el complejo de iniciación de la transcripción, evitando la elongación de la cadena de ARN por la ARN polimerasa. En este experimento utilizamos la actinomicina D antes y después de la exploración de un ambiente novedoso, para bloquear la transcripción de *Arc*.

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

HIPÓTESIS:

1. El efecto inhibitorio de la actinomicina D en la transcripción de *Arc* durará aproximadamente 2 horas, como lo reportado en la literatura.
2. La administración de actinomicina D inmediatamente después de la exploración de un ambiente novedoso, inhibirá la transcripción sostenida de *Arc* hasta por 8 horas.

OBJETIVO GENERAL

Dilucidar si la expresión prolongada del gen *Arc* (inducido por la conducta de exploración de un ambiente) se debe a un mecanismo de transcripción sostenida, mediante la administración de un fármaco (actinomicina D) que inhibe la transcripción.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desarrollar una estrategia farmacológica para la administración efectiva del inhibidor transcripcional actinomicina D.
2. Realizar cirugías en ratas para colocar cánulas en el ventrículo lateral derecho y administrar la actinomicina D vía intraventricular.
3. Estandarizar la dosis y la temporalidad del fármaco actinomicina D, para generar una inhibición transcripcional efectiva al 90%.
4. Administrar la actinomicina D en el ventrículo lateral derecho de ratas antes de que exploren un ambiente, para impedir el inicio de la transcripción de *Arc*.
5. Administrar la actinomicina D en el ventrículo lateral derecho de ratas después de que exploren un ambiente, para inhibir la transcripción sostenida de *Arc*.

ANIMALES, MATERIAL Y MÉTODO

Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo a los lineamientos bioéticos del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México para el uso de animales experimentales, de acuerdo con las normas estipuladas en la “Guide for care and use of laboratory animals” del NIH (1996).

Animales. Se utilizaron 34 ratas macho de la cepa Wistar de 4 meses de edad, con un peso aproximado de 400-500 gr. Separadas individualmente y sometidas a un ciclo invertido de luz-oscuridad de 12 hrs.

Desde su traslado del bioterio al laboratorio, los animales fueron manipulados diariamente. La manipulación consistía en retirarlas de su caja habitación, tomarlas con una toalla blanca, sujetarla y sostenerla por periodos de tiempo no mayores de 2 minutos. Lo anterior se realizó para acostumbrar a los animales a la manipulación del experimentador y para eliminar las variables asociadas a ésta. Se realizaron todos los esfuerzos posibles para minimizar el número de animales y su sufrimiento durante los procedimientos quirúrgicos.

Materiales y Métodos

Conducta de exploración

Los animales que fueron sometidos a la exploración de un ambiente novedoso, fueron colocados por un periodo de 5 minutos dentro de una caja cuadrada de 65x65 cm, hecha de acrílico transparente, la caja estaba forrada por fuera y está dividida en 9 cuadrantes equidistantes. Esta caja o campo abierto de exploración, estaba colocada en un cuarto con iluminación tenue. Para realizar este procedimiento, los animales fueron retirados de sus cajas habitación, tomados con una toalla blanca y trasladados al cuarto contiguo donde se encontraba el campo abierto; una vez dentro de campo abierto, se sometió al animal a una exploración forzada, dejándolo 15 segundos en cada cuadrante, para garantizar que recorriera toda la caja, hasta que se cumplieran los 5 minutos.

Administración intraperitoneal de actinomicina D

Después de 7 días de habituar a las ratas a la manipulación asociada a la administración de la droga, los animales fueron tratados con actinomicina D mediante una inyección intraperitoneal con la siguiente dosis: 3.5 mg en 1 ml de de NaCl al 0.9% pH 7.

Cirugía esterotáxica para canulación en ventrículo lateral derecho

Este procedimiento primero se realizó con un solo animal, con la finalidad de probar las coordenadas para la futura administración de actinomicina D intraventricular (la administración intraparenquimal no fue efectiva). Una vez realizado el procedimiento dicho piloto, 31 ratas fueron operadas.

Para el procedimiento de canulación, se utilizó como anestésico 3 ml de xilacina (6 mg/kg) y ketamina (70 mg/kg). La medida de la cánula fue de 12 mm, 4 mm quedaron intracraneal y 8 mm quedaron externos al cráneo; el inyector se construyó de 12.5 mm. Las coordenadas para canular el ventrículo lateral derecho fueron las siguientes:

	Coordenadas
Antero-Posterior	-0.92 mm
Lateral	-1.5 mm
Dorso-Ventral	-4 mm

Tabla 1. Coordenadas para realizar la canulación en el ventrículo lateral derecho. (Obtenidas de Paxinos y Watson, 1998)



Figura 7. Fotografías del procedimiento de canulación. En la imagen de la derecha se observan dos ratas en el estereotáxico. A la izquierda, un animal con la incisión hecha, se observa el cráneo descubierto y limpio, con el tornillo inserto en el hemisferio izquierdo.

Administración intraventricular de la actinomicina D

La administración del tratamiento intraventricular unilateral con actinomicina D, se llevó a cabo bajo los siguientes parámetros: concentración del fármaco de 6.8 µg/ 1 µL; tasa de inyección de 2 µl / 1 min (por 5 minutos); recibiendo un total de 68 µg actinomicina D en 10 µl NaCl al 0.9 % pH 7.

En el caso de los animales que recibieron vehículo en lugar de actinomicina D, la tasa de inyección fue la misma, recibiendo un total de 10 µl de NaCl al 0.9 % pH 7.

Sacrificio

Todos los animales fueron sacrificados por decapitación

Obtención y procesamiento de los tejidos cerebrales

Después de la decapitación, los cerebros se extrajeron rápidamente, se colocaron en un molde de plástico de PVC, el cual se sumergió en una solución de 2-methyl-butano, enfriada a -30°C mediante un baño en alcohol etílico y hielo seco. Los cerebros se almacenaron en un congelador a -70°C. Posteriormente fueron seccionados con el uso de una matriz de sección para tejido de 2.7 cm por 2.5 cm de área interior (electrón microscope sciences). Se seleccionó sólo el hemisferio izquierdo por cada animal (las comparaciones de la expresión ínter-hemisféricas no mostraron resultados estadísticamente significativos), partiendo desde la mitad del fórnix hasta el final de la corteza entorrinal, se utilizó como referencia el límite entre la corteza y el cerebelo. El procedimiento con la matriz fue el siguiente: se colocó la primera navaja en el límite de la corteza y el cerebelo; la segunda, 2 mm anterior a la primera; y la tercera 8 mm, anterior en relación a la segunda (Figura 8-A). De esta manera, todas las hemisecciones de cada uno de los animales, presentaron una altura semejante de corte (± 0.5 mm). Además, para garantizar la mejor equidistancia posible en la altura antero-posterior, se colocaron los cerebros en el molde de plástico con la parte posterior en la base del molde, ya que esta región era la más equidistante posible. De esta forma, en un molde de plástico se colocaron los hemi-cerebros de un animal de cada grupo (es decir, 8 hemi-secciones en cada molde). Los tejidos situados en el molde fueron cubiertos con

Tissue tek OCT, que consiste en una solución de glicoles solubles en agua y compuestos resinosos que proveen una matriz a los especímenes para seccionado criostático a

temperaturas de -10°C o menores (Figura 8-B). Como resultado se formaron cuatro bloques que contenían 8 muestras, una de cada grupo experimental.

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

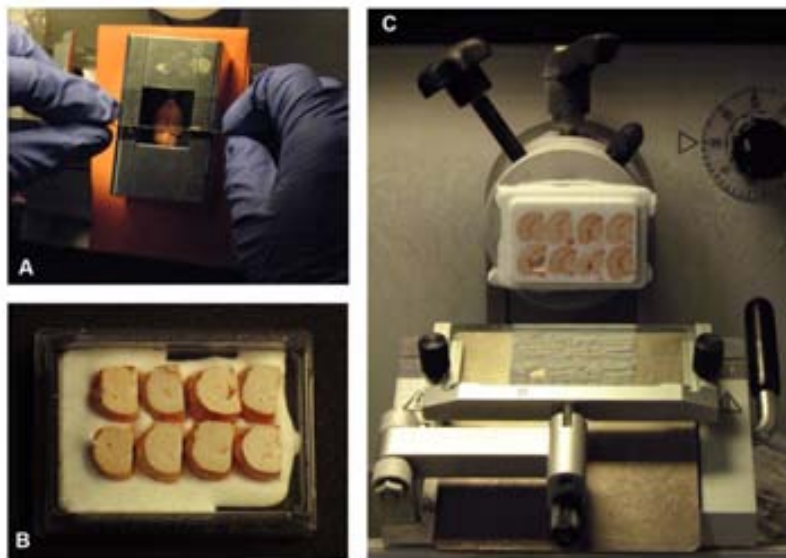


Figura 8. Fotografías del procedimiento para la construcción del bloque; cada bloque contiene un hemi-cerebro de cada grupo experimental (8 cerebros). En A se muestra como se corta un cerebro en la matriz de sección; en B se observan los hemi-cerebros montados en un molde con una base de “Tissue tek OCT”; en C se muestra el bloque de hemi-cerebros montado en el criostato, donde se aprecia un corte listo para montar en la laminilla.

Histología

Los cerebros fueron procesados para hibridación *in situ* fluorescente, para detectar tanto el intrón de *Arc* (transcrito reciente), como el gen completo de *Arc* en el citoplasma (transcrito tardío). Se realizó la síntesis de la sonda de ARN utilizando un molde de ADN obtenido de un plásmido diseñado en los laboratorios del Dr. Paul Worley (Universidad Johns Hopkins, Baltimore) y del Dr. John Guzowski (Universidad de California, Irvine). Del hipocampo se seleccionaron de 4-6 tejidos adyacentes por bloque y se colocaron en rejillas de plástico para el tren de tinción (Tissue Tek slide staining set Sakura). Los tejidos fueron fijados en 4% de paraformaldehído (pH 7.4), después se colocaron en una solución de acético anhídrido (1.25 ml de acético anhídrido SIGMA, 3.7 ml de trietanolamina SIGMA, 2.3 g de NaCl SIGMA en 250 ml de agua DEPC SIGMA). Posteriormente los tejidos se lavaron con 2XSSC (dilución 1:10 en agua DEPC de la solución 20xSSC SIGMA) y después se colocaron en una solución de acetona y metanol (50% de cada uno a -20°C), al terminar se lavaron una vez más con 2XSSC. Después, se incubaron en una cámara hermética con papel secante humedecido con 50% de formamida en 1XSSC, la cámara contenía una solución de buffer de pre-hibridación (SIGMA), y se dejó reposar por 30 minutos. Una vez pre-hibridados, los tejidos fueron incubados (en la misma cámara) con las sondas diluidas (300 ng de sonda por cada 100 µl de buffer de hibridación) en el buffer de hibridación (SIGMA), se vertió entre 95 y 110 µl de esta solución por cada laminilla y finalmente, se colocó un cubre objetos. La cámara de incubación con las laminillas fue colocada en un horno de hibridación a 56°C por un periodo de entre 16 y 18 horas. Después de esto, las muestras se lavaron en 3 ocasiones con 2XSSC y RNasa A en 1XSSC para deshacerse del resto de la sonda no hibridada. Una vez lavado el tejido se procedió a incubarlo por 24 horas, con un anticuerpo peroxidado (Roche) dirigido contra digoxigenina (para la sonda completa de *Arc*). Después se realizó la detección con un sistema TSA de amplificación fluorescente Cy3 (para el intrón); la detección del segundo ARNm (la sonda completa) se hizo incubando este mismo tejido con un anticuerpo dirigido a fluoresceína y revelado con el mismo sistema de fluorescencia usando un fluorocromo diferente, como FITC. Los núcleos de las células se tiñeron con el marcador de ADN DAPI (Molecular Probes®). Los tejidos fueron cubiertos con Vectashield® para proteger la fluorescencia y se colocó un

cubreobjetos. Exteriormente, los bordes del cubreobjetos se fijaron con barniz de uñas transparente.

Microscopía confocal

Se utilizó un microscopio confocal Zeiss LSM meta 510 para capturar las imágenes confocales. El objetivo empleado fue de 40x, con 1 unidad Airy para calcular la apertura del diafragma confocal o "pinhole" para todos los casos. Todas las imágenes se tomaron con el panorama más amplio del objetivo 40x, utilizando el plano Z desde lo más profundo de la tinción hasta lo más superficial. De esta manera se obtienen apilados de imágenes que en promedio tienen un grosor de $\pm 18 \mu\text{m}$ y consisten de un total aproximado de 50 imágenes a lo largo de los diferentes planos de la muestra, cada una con aproximadamente 430 nm de grosor y una zona de traslape del 25%. Para la captura de los apilados de imágenes se utilizaron 3 láseres con los que se excitaron de manera independiente cada uno de los fluoróforos, utilizando el sistema multitrack. Para detectar el intrón de *Arc*, el cual se visualiza en rojo, se excita Cy3 con el DPSS de 561 nm y se utilizó un filtro dicróico de 575-615 nm; para detectar la sonda completa de *Arc*, la cual se visualiza en verde, se excitó FITC con el argón de 488 nm, utilizando un filtro dicróico de paso alto de 505 nm; finalmente, para detectar la tinción nuclear, la cual se visualiza en azul, se excitó DAPI con el HeNe de 633 nm utilizando un filtro dicróico de 640-693 nm. La definición de los parámetros de captura de los apilados (el poder del láser, la ganancia y el contraste confocal u "offset"), se estableció en el tejido de los animales controles, que como se explicó previamente, cada laminilla cuenta con un tejido de un animal control más uno de cada grupo experimental.

Análisis de imágenes

Para realizar la clasificación de las células, se utilizaron los apilados de imágenes confocales. Con el uso de reglas de inclusión, basadas en la determinación de los planos medios de la imagen, se identificaron las unidades neuronales que tienden a estar completas en todo el grosor ($\sim 18 \mu\text{m}$) del tejido, estas reglas también permiten evitar el sesgo en la inclusión de unidades por su tamaño, mediante la inclusión de todas las unidades que se encuentren en los planos medios, y se excluyen las unidades gliales, las

cuales se identifican por sus características en tamaño y por una tinción distinta (opaca y homogénea) en la superficie. La clasificación de las células se hizo de la siguiente manera: *Arc* nuclear positiva, aquellas solamente presentan tinción del intrón de *Arc* en el núcleo; *Arc* citoplásmico positivo, como aquella que exclusivamente presenta tinción de la sonda completa de *Arc* alrededor del núcleo; y *Arc* doble, como aquellas en las que coinciden las dos clasificaciones definidas previamente.

La clasificación se realizó con los apilados de imágenes, el conteo final para cada GD completo se realizó utilizando la imagen de la reconstrucción (se realiza empalmado la sucesión de fotografías que conforman banda superior de un GD), y se descartaron las células que aparecieron en el área de traslape con la imagen consecutiva en la reconstrucción. De esta manera, las reconstrucciones se usaron como referencia para la cuantificación del número de células en las diferentes clasificaciones y permitieron estimar el número total de células granulares por unidad de volumen. Estas estimaciones se realizaron utilizando los datos obtenidos por conteos exhaustivos previos (hechos en 200 imágenes confocales de células granulares del GD de animales adultos maduros) (Rosi, et al. 2005; Ramírez-Amaya, et al. 2005). El procedimiento consiste en medir el área de la banda de células granulares en la reconstrucción y calcular el volumen, utilizando el dato de grosor obtenido en los apilados de imágenes confocales. Para lo anterior, se utiliza la siguiente fórmula para la estimación del número de células:

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

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

Para el análisis que se presenta en este trabajo únicamente se consideró la banda superior, ya que esta es la que responde principalmente a la exploración espacial expresando *Arc* (Chawla, et al. 2005; Ramírez-Amaya, et al. 2005). Todo el análisis que se describió

previamente se realizó mediante el uso del sistema Metamorph y las reconstrucciones se hicieron con el uso de Adobe Photoshop.

Cuantificación y análisis estadístico

Se obtuvo el estimado de células granulares incluidas en el estudio de cada animal y también el número de células con Arc en el citoplasma (completo), Arc en el núcleo (intrón) y las doble marcadas (citoplasmático y nuclear). Del total de células granulares y de las células clasificadas para cada condición (sumando todas las imágenes analizadas por animal) se calculó la proporción de células para cada clasificación por animal. A estos datos se les aplicó un “ANOVA” de una vía y también la prueba posthoc Bonferroni, que corrige para comparaciones múltiples. Aunque la N de cada grupo es de 2, los estudios en los que se usa el análisis “catFISH”, la variabilidad se reduce con la inclusión de un mayor número de unidades celulares, más que con el incremento en la N de animales.

Protocolos

Piloto 1

Actinomicina D intraperitoneal

Los animales sometidos a este procedimiento (n=8) fueron habituados por 7 días consecutivos a la manipulación asociada a la administración de la droga. Posterior a la habituación, se formaron grupos experimentales que incluyeron animales con el tratamiento intraperitoneal de actinomicina D antes de la exploración del ambiente y otros que recibieron el tratamiento intraperitoneal de actinomicina D después de haber explorado, así mismo se incluyeron animales intactos y animales controles (sin tratamiento) a los que sólo se les permitió explorar, lo que resultó en los siguientes grupos:

2 ratas intactas

2 ratas sólo con conducta de exploración

2 ratas con actinomicina D (10 minutos) previa a la exploración

2 ratas con actinomicina D (10 minutos) posterior a la exploración

Posterior a la conducta de exploración todos los animales fueron sacrificados pasados 30 minutos exceptuando a los 2 animales controles intactos, los cuales se sacrificaron el mismo día en horarios similares a los grupos con tratamiento. Una vez realizado el procedimiento de extracción y procesamiento de los tejidos, éstos recibieron tratamiento histológico de hibridación in situ para la identificación del gen Arc.

Piloto 2

Cirugía de canulación en el ventrículo lateral derecho

Este piloto se realizó con la finalidad de identificar las coordenadas para el procedimiento quirúrgico de canulación en el ventrículo lateral derecho. Una vez cauterizada la herida (1 semana después) inyectamos azul de pontamina como marcador para identificar la difusión de la solución a través del ventrículo. Probamos con esta estrategia para la futura administración de actinomicina D vía intraventricular, debido a que con la dosis empleada no tuvo ningún efecto aplicada vía intraperitoneal. El piloto incluyó un único animal (peso de 520 gr), el cual fue sacrificado una vez pasados 20 minutos terminada la inyección con del marcador. El tejido fue procesado como se describe en el método; posteriormente fue seccionado y rebanado para identificar si la lesión de la cánula estaba en el sitio correcto y también para observar la difusión del líquido administrado coloreado en azul.

Piloto 3

Actinomicina intraventricular

Este experimento piloto se llevó a cabo para probar con la nueva vía de administración (intraventricular) la efectividad de la actinomicina D en la inhibición de la transcripción de Arc (N total =8). Unos grupos experimentales recibieron la actinomicina D antes de la exploración del ambiente (15 minutos o 1 hora antes) y otros inmediatamente después. Además de los grupos experimentales con tratamiento de actinomicina D, se añadió un animal intacto como control (sólo habituado a la manipulación), y otro animal que únicamente exploró. La n de cada grupo se especifica abajo:

- 1 rata intacta
- 1 rata sólo con conducta de exploración (sin tratamiento)
- 2 ratas con actinomicina D 1 hora antes de la exploración
- 2 ratas con actinomicina D 15 minutos antes de la exploración
- 2 ratas con actinomicina D inmediatamente después de la exploración

De los animales que recibieron la actinomicina D antes de que exploraran el campo abierto, 3 fueron sacrificados inmediatamente después de la exploración (los 2 con actinomicina D administrada 1 hora antes y un animal del grupo de 15 minutos antes), el otro animal (con tratamiento 15 minutos antes de la exploración) se sacrificó 30 minutos después de haber explorado. Los dos animales a los que se les administró la actinomicina D después de la exploración fueron sacrificados 2 horas después de la misma. Los tejidos fueron obtenidos y procesados según el método (arriba descrito) para recibir tratamiento histológico para la detección de *Arc* mediante hibridación *in situ*.

Experimento 1

¿La administración de actinomicina D previa a la exploración de un ambiente puede impedir el inicio de la transcripción de *Arc*?

Este experimento se diseñó para inhibir la transcripción de *Arc* mediante la administración intraventricular de actinomicina D. El procedimiento (N total=11, cada grupo n=2) consistió en la administración del fármaco a diferentes tiempos (15, 60 o 120 minutos) previos a la exploración del ambiente novedoso, posterior a los 5 minutos de exploración los animales fueron sacrificados. Como control se utilizaron grupos a los que se les administró vehículo (solución salina) y que también fueron expuestos a la exploración del campo abierto y sacrificados a los mismos tiempos que los que recibieron actinomicina D; otras dos ratas fueron sacrificadas el mismo día y a horas similares que los grupos que recibieron tratamiento farmacológico, estos animales se utilizaron como controles intactos (Figura 9).

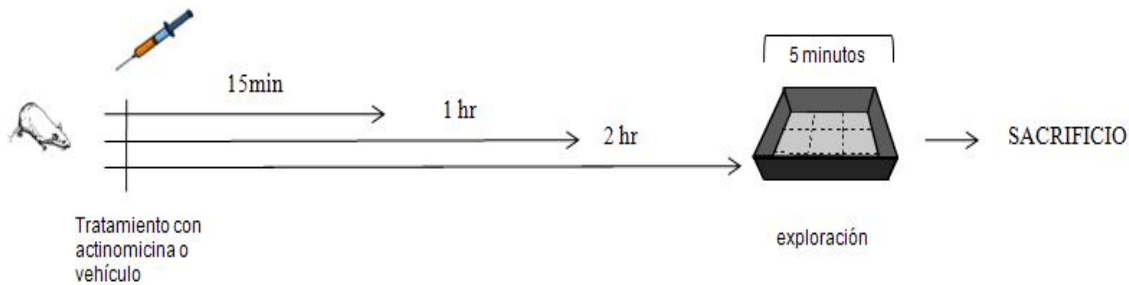


Figura 9. Cronograma del experimento 1 en el que se muestra la secuencia del procedimiento: tratamiento con actinomicina D o vehículo, intervalo temporal de 15 minutos, 1 hora o 2 horas, según el animal; estimulación conductual por 5 minutos en campo abierto, e inmediatamente después el sacrificio

Con los cerebros de los animales se elaboraron 2 bloques (ver procedimiento en el método de obtención y procesamiento de tejidos), uno con 5 hemi-cerebros que incluía: los tres puntos temporales con actinomicina D (15, 60 y 120 minutos), un vehículo (60 minutos) y un control intacto. El segundo bloque incluyó 6 hemi-cerebros, 3 de los grupos experimentales con actinomicina D (15, 60 y 120 minutos), dos de vehículos (15 y 120 minutos) y uno de un control intacto. Los tejidos obtenidos fueron procesados para hibridación *in situ* para la identificación de *Arc*.

Experimento 2

¿La administración de actinomicina D después de la exploración de un ambiente puede inhibir la transcripción sostenida de *Arc*?

En este experimento se administró actinomicina D intraventricularmente a ratas que previamente habían explorado un ambiente novedoso, con la finalidad de ver los efectos de la actinomicina D en la transcripción sostenida de *Arc*. El procedimiento fue el siguiente: las ratas (N total=16, cada grupo n=2) fueron habituadas a la manipulación asociada con el procedimiento de exploración (ver método de conducta de exploración) durante una semana. El día del experimento fueron sometidas a la conducta de exploración e inmediatamente después se les administró actinomicina D o vehículo (según el grupo experimental) y fueron sacrificadas a diferentes tiempos (30, 120 o 480 minutos después); otros 2 animales fueron sometidos a la exploración pero no se les administró ningún tratamiento y se utilizaron como controles con actividad. Finalmente,

otras dos 2 ratas se sacrificaron sin recibir tratamiento ni exploración, las cuales sirvieron como controles intactos. Al final resultaron 8 grupos experimentales: 3 grupos con actinomicina D (uno sacrificado 30 minutos después, otro a los 120 minutos y otro 480 minutos después); 3 grupos con vehículo sacrificados a los mismos tiempos que los que recibieron actinomicina D; 1 grupo al que únicamente se le sometió a la exploración, y finalmente 1 grupo como control intacto (Figura 10).

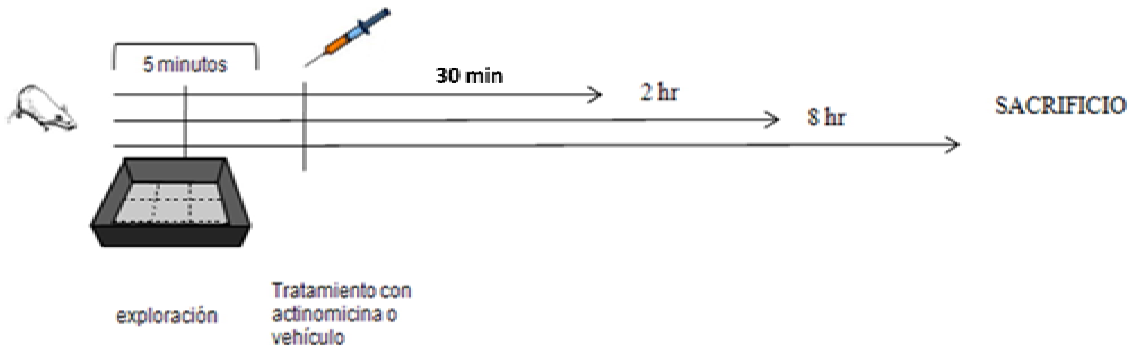


Figura 10. Se muestra la secuencia del procedimiento del experimento 2: estimulación conductual en campo abierto durante 5 minutos, seguido del tratamiento con actinomicina D o vehículo; y finalmente, según el animal, el sacrificio después de 30 minutos, 2 horas u 8 horas.

Con los cerebros de estos grupos experimentales se formaron 2 bloques (ver procedimiento de obtención y procesamiento de tejidos), cada uno con 8 hemi-cerebros, uno de cada grupo experimental (3 con actinomicina y 3 con vehículo) más dos controles sin tratamiento (uno que sólo exploró y el otro intacto). Los tejidos fueron sometidos a un proceso histológico de hibridación *in situ* para la identificación de *Arc*.

RESULTADOS

Piloto 1

Actinomicina D intraperitoneal

Después de procesar las laminillas para hibridación *in situ* fluorescente, la observación de los tejidos realizada con microscopio de fluorescencia, no reveló diferencias en la tinción histológica entre los diferentes grupos, aunque nos fue claro que también había mucho ruido de fondo. Posteriormente, con el uso del microscopio confocal se observó que todos los grupos, incluyendo los de los animales tratados con actinomicina D, presentaron evidencia notable de transcripción de *Arc*, exceptuando los animales sin exploración. Por lo que dedujimos que la administración de actinomicina D por vía intraperitoneal, dados los tiempos, la dosis empleada y el tiempo de administración no fueron efectivos para inhibir la transcripción de *Arc* inducida por la conducta. De esta manera consideramos que la dosis para inhibir la transcripción tendría que ser más elevada o bien, que el tiempo para que la droga tuviera un efecto habría de prolongarse. Ambas circunstancias representaban un problema para el propósito de nuestro proyecto. Incrementar el tiempo impediría estudiar condiciones en las que ya se indujo la transcripción y en las cuales quisiéramos bloquear exclusivamente la transcripción reciente, dado que la ventana temporal de efecto de la actinomicina D sería muy amplia. Por otra parte, el hecho de que la dosis de actinomicina D tuviera que incrementarse, representaba un problema ya que la disponibilidad de la actinomicina D comercial es baja y el costo es muy alto.

Piloto 2

Cirugía de canulación en el ventrículo lateral derecho

Dada la experiencia con la administración intraperitoneal, decidimos intentar administrar la actinomicina D intraventricularmente, para ello implantamos cánulas en el ventrículo lateral derecho y evaluamos la efectividad de la administración por esa vía, mediante la administración e identificación de una solución de color que pudiera ser trazada.

Como se puede apreciar en la Figura 11, de manera visual pudimos comprobar que la cánula insertada mediante dicho procedimiento fue efectiva. El azul de pontamina que

administramos en el ventrículo, nos permitió observar más detalladamente que este método es efectivo para difundir nuestro fármaco (actinomicina D).



Figura 11. Fotografía de un corte coronal de encéfalo de rata montado en “Tissue tek OCT®”. Se pueden apreciar los ventrículos laterales coloreados con azul de pontamina, debido a la administración del colorante en el ventrículo lateral derecho, también se observa la lesión provocada por la cánula.

Piloto 3

Actinomicina intraventricular

El piloto 3 nos mostró que la vía de administración y la dosis del fármaco fueron efectivas. También se obtuvieron los parámetros temporales en los que la droga comienza a tener efecto. En la tabla 2 se agruparon los grupos experimentales, que en su mayoría no presentaron actividad transcripcional de *Arc*. En esa misma tabla se presenta la evaluación de la temporalidad de la droga.

Actinomicina D 1hr antes. Sacrificio inmediato post exploración	Presenta poco Arc intrón	A la 1:06 min decae ligeramente el efecto de la actinomicina
Actinomicina 15min antes/sacrificio inmediato post exploración	No presenta Arc intrón	A los 20 minutos ya hay efecto de la actinomicina D
Actinomicina 15min antes/sacrificio 30min después	No presenta Arc intrón	A los 50 minutos hay efecto de la actinomicina
Actinomicina después de la exploración/sacrificio 2hr. Después	No presenta Arc intrón	A las 2hr efecto actinomicina vs. poco efecto esperado
Control con exploración	Presenta Arc intrón	-----
Control sin exploración	No presente Arc intrón	-----

Tabla 2. Grupos experimentales, separados por tipo de procedimiento (columna 1), nivel de actividad (columna 2) y resultado (columna 3). Los grupos que recibieron actinomicina D (antes o después de explorar) no presentaron actividad de *Arc*, sólo el grupo control mostró actividad.

Los grupos experimentales con actinomicina D, no presentaron transcripción de *Arc*, salvo en el caso del grupo experimental con actinomicina D 1hr antes de explorar, que presentó

pocas células expresando *Arc* (esto se obtuvo con conteos no exhaustivos), lo que nos proporcionó información de la posible curva dosis-efecto del fármaco. Al parecer, los efectos de la droga a la hora de su aplicación, comienzan a verse abatidos. Así mismo, el grupo con actinomicina D 15 minutos antes de explorar, no presentó expresión de *Arc* en lo absoluto, lo que sugería que el fármaco disminuía considerablemente la transcripción desde poco tiempo después de haberse aplicado.

Aunque los datos anteriores no fueron analizados estadísticamente, los conteos preliminares nos permitieron delimitar una ventana temporal de entre 20 minutos y 1 hora en la que se observa el mayor efecto. Y con estos resultados procedimos a realizar los 2 experimentos principales. El primero, diseñado para evaluar la curva temporal del efecto de la actinomicina D (aplicándola antes de la exploración), y otro, para ver su efecto en la transcripción sostenida del gen expresión inmediata *Arc* (aplicándola después de la exploración, es decir, una vez iniciada la transcripción de *Arc* inducida por la conducta.

Experimento 1

¿La administración de actinomicina D previa a la exploración de un ambiente puede impedir el inicio de la transcripción de *Arc*?

Como resultado del procesamiento de los tejidos, se obtuvieron 140 laminillas, de las cuales, se fueron seleccionando grupos de 8 laminillas para el procedimiento histológico (2 laminillas para cada bloque, ver descripción en el método).

Se capturaron 288 imágenes con microscopía confocal de los diferentes grupos experimentales. Con el análisis de la imágenes de la región de CA1, se realizaron los conteos de células *Arc* positivas (ver método de cuantificación y análisis estadístico) para cada condición experimental.

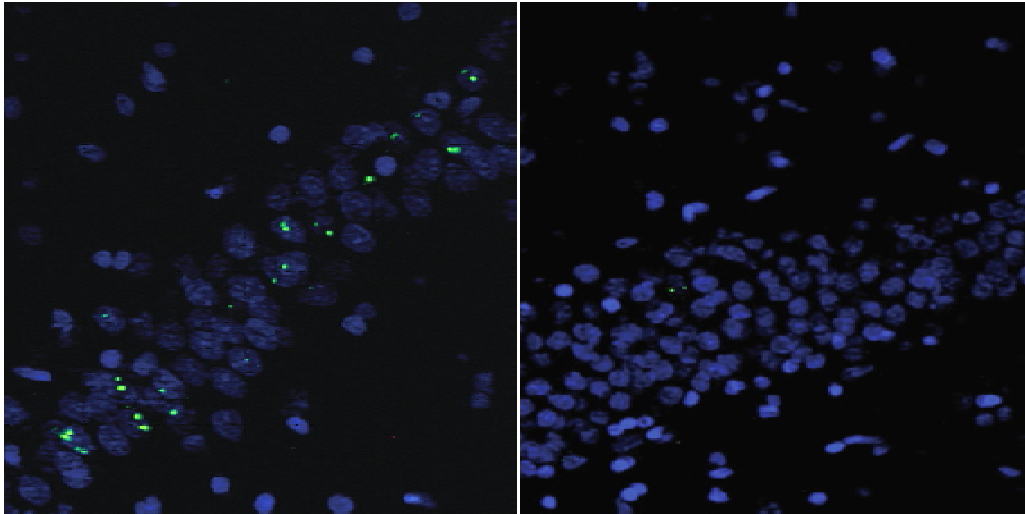


Figura 12. Fotografías con microscopía confocal a 40x. En color azul se identifican los núcleos de las neuronas (marcados con DAPI) y en color verde se identifica el transcrito temprano de *Arc* (marcado con FITCI). En la imagen de la izquierda se observa un segmento de CA1 correspondiente a un animal con vehículo 1 hora antes de la estimulación conductual. En la imagen de la derecha se muestra un segmento de CA1 correspondiente a un animal con actinomicina D 1 hora antes de la estimulación conductual.

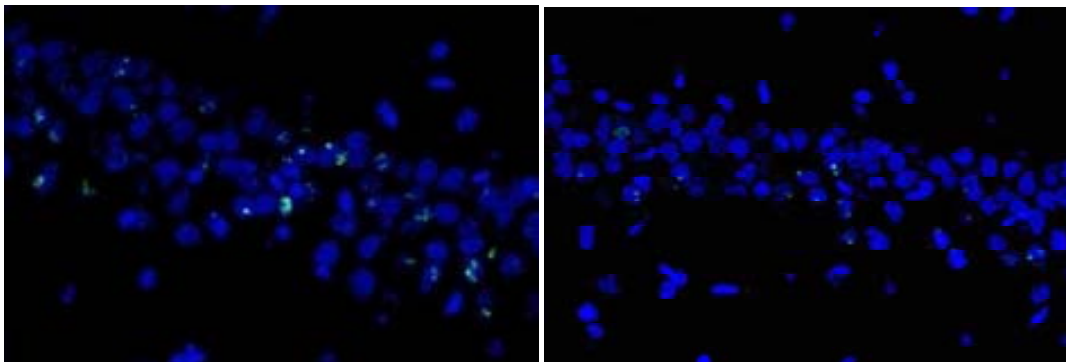


Figura 13. Fotografías con microscopía confocal a 40x. En color azul se identifican los núcleos de las neuronas (marcados con DAPI) y en color verde se identifica el transcrito temprano de *Arc* (marcado con FITCI). La imagen de la izquierda muestra un segmento de CA1 que corresponde a un animal que recibió vehículo 15 minutos antes de la estimulación conductual. En la imagen de la derecha se muestra una fotografía que pertenece a un animal que recibió actinomicina D 15 minutos antes de la estimulación conductual, se puede observar que hay menos actividad de *Arc* que en la imagen de la izquierda.

El análisis estadístico realizado mostró que la actinomicina D, administrada previa a la exploración de un ambiente novedoso, interfiere con el inicio de la transcripción del gen *Arc* en las células piramidales de CA1. El ANOVA indicó diferencias significativas ($F_{4,6} = 58.134$ $p < 0.0001$) entre los diferentes grupos. En la Figura 14 podemos observar la gráfica con los porcentajes totales de células activadas (expresando *Arc*), para cada grupo experimental. Como se puede constatar en la Figura 14, el grupo con mayor porcentaje de

células expresando *Arc* corresponde al que recibió vehículo (~28% de células expresando *Arc*); en segundo lugar, se encuentra el grupo que recibió la actinomicina D 2 horas antes de la exploración, con un porcentaje cercano al 14%; el resto de los grupos (actinomicina 1 hora antes y actinomicina 15 minutos antes) mostraron porcentajes muy bajos de expresión, menores al 6 %, los cuales no resultaron diferentes del porcentaje de expresión del grupo control (~2.5%). El análisis post hoc con la prueba de Bonferroni, arrojó diferencias significativas (por debajo del criterio de $p < 0.0001$) entre el grupo control y el grupo que recibió vehículo. También se encontraron diferencias significativas en las comparaciones hechas entre los tres grupos que recibieron Actinomicina D (2 horas, 1 hora y 15 minutos antes) y el grupo que recibió vehículo ($p < 0.0004$; $p < 0.0001$ y $p < 0.001$, respectivamente).

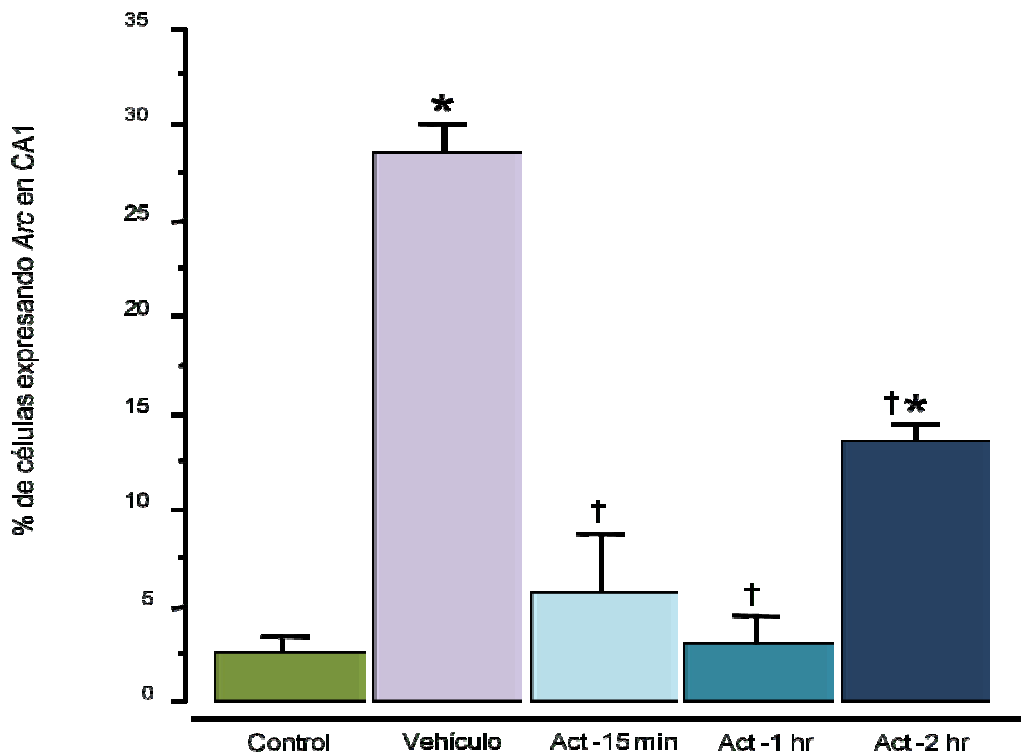


Figura 14. Distribución de los porcentajes de células *Arc* positivas en los diferentes tratamientos. La actividad del vehículo está aproximadamente en un 27%, mientras que en los grupos con actinomicina D todos están por debajo del 15%. De manera particular el grupo con actinomicina D administrada 1 hora antes, presenta un porcentaje de actividad menor al 5%, siendo el más abatido en comparación con los grupos de 15 minutos y 1 hora. Las barras con *son diferentes del control; las barras con † son diferentes del vehículo.

Con este análisis se pudo observar que los grupos que fueron tratados con actinomicina D, entre 15 minutos a 1 hora, no tuvieron una proporción de células con expresión de *Arc*

que fuera diferente del grupo control; en el caso del grupo que recibió la dosis de actinomicina 2 horas antes de la exploración, podemos observar un incremento en la actividad de *Arc*, pero que aún es diferente del vehículo ($p=0.0004$); en este grupo también hubo diferencias significativas con el grupo control ($p=0.0031$), lo que indica que si bien ya el número de células que expresa *Arc* es estadísticamente diferente de la condición sin estimulación, la transcripción de *Arc* no ha regresado todavía a niveles normales, como la que presenta el grupo que recibió vehículo.

Experimento 2

¿La administración de actinomicina D después de la exploración de un ambiente puede inhibir la transcripción sostenida de *Arc*?

Como resultado del procesamiento de los tejidos, se obtuvieron 140 laminillas, de las cuales, se fueron seleccionando grupos de 8 laminillas para el procedimiento histológico (2 laminillas para cada bloque, ver descripción en el método).

Los resultados histológicos (hibridación *in situ*) óptimos para realizar el análisis, se ejemplifican en la Figura 15. En ella se puede apreciar tanto el transcrito temprano como el transcrito tardío del ARN de *Arc*. El transcrito tardío del ARNm (identificado en color verde), rodea al núcleo (en color azul) de la célula granular. Este transcrito, permite identificar la expresión de *Arc* asociada con un evento que ocurrió aproximadamente 30 minutos antes del sacrificio del animal. El transcrito reciente de *Arc* (visualizado como dos puntos amarillos, debido a la superposición entre el verde y el rojo), aun dentro del núcleo, comenzó su transcripción aproximadamente 5 minutos antes del sacrificio.

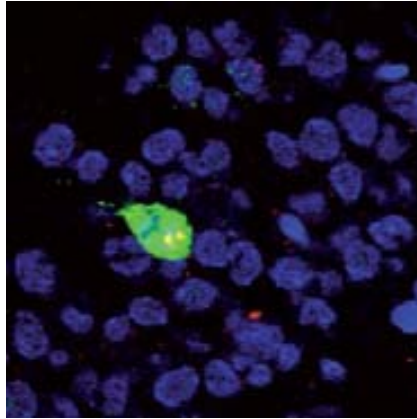
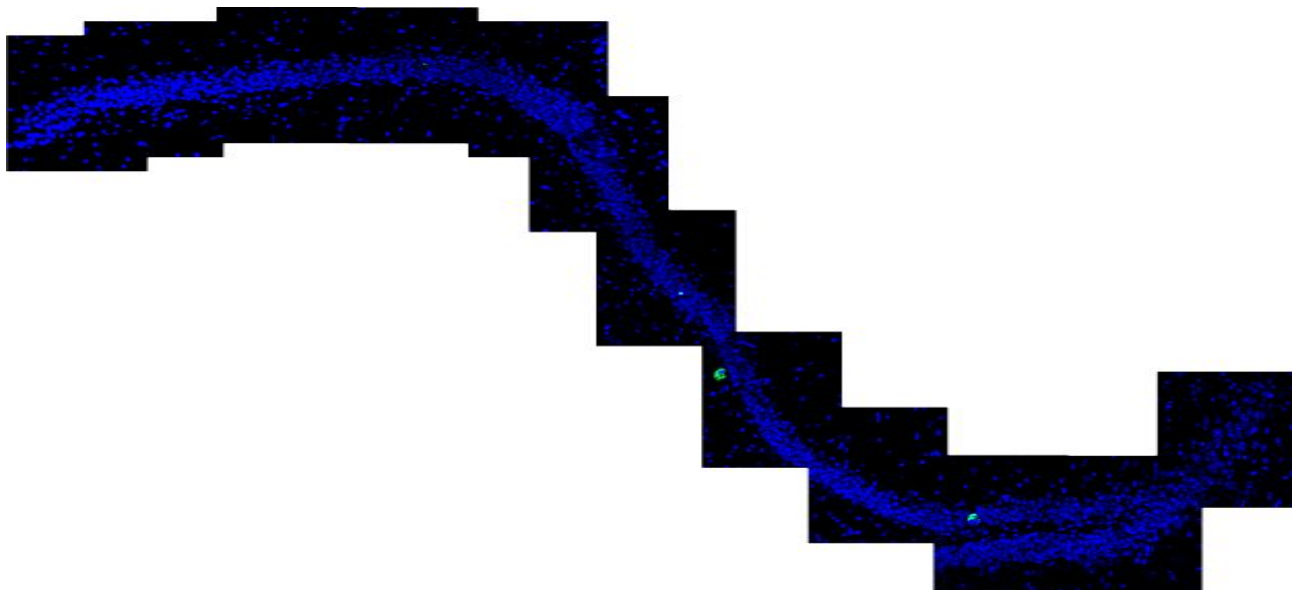


Figura 15. Fotografía en microscopía confocal con objetivo 40x. En color azul se muestran los núcleos celulares (marcados con DAPI), en verde (identificado con FITCI) observamos el transcrito tardío de *Arc*. En el centro de la imagen se observa una célula granular del giro dentado expresando en transcrito temprano (dos puntos amarillos) de *Arc* y el transcrito tardío (que rodea el núcleo celular).

Se obtuvieron 511 imágenes con microscopía confocal de los diferentes grupos experimentales de este experimento, con esas imágenes se elaboraron 56 reconstrucciones (Figura 16) de la banda superior del giro dentado (ver método de análisis de imágenes).

Figura 16. Fotografía con microscopía confocal con 40x. Reconstrucción de la banda superior del giro dentado, la reconstrucción cuenta con 12 tomas superpuestas de un solo plano. En color azul se



identifican los núcleos de las neuronas (marcado con DAPI), en verde se identifica el transcrito tardío de *Arc* (rodeando el núcleo). La imagen corresponde a un animal que recibió actinomicina D y se sacrificó 8 horas después.

En la Figura 17 se muestran dos grupos experimentales que recibieron el mismo procedimiento experimental, con la diferencia de haber recibido vehículo o actinomicina D.

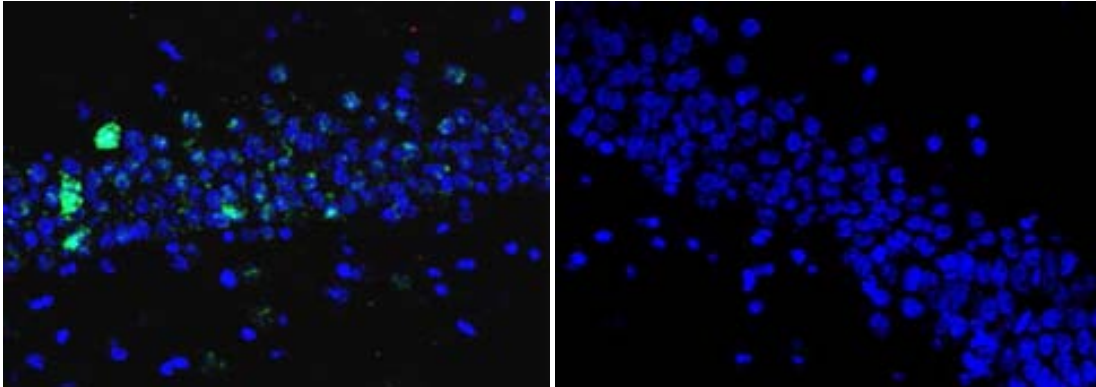


Figura 17. Fotografías de microscopía confocal con 40x. Secciones del giro dentado, en azul se observan los núcleos; en color verde el transcrito tardío de *Arc* (marcado con FITCI). Las fotografías son de dos animales sacrificados 2 horas después de haber explorado; a la izquierda el grupo que recibió vehículo y a la derecha el grupo que se le administró actinomicina D.

El análisis de las imágenes se realizó utilizando como guía la reconstrucción de un GD, y en ella se van colocando los sitios donde se localizaron células activadas (en cada imagen individual de las que se compone una reconstrucción). En las Figuras 18 y 19 se presentan dos ejemplos de este análisis.

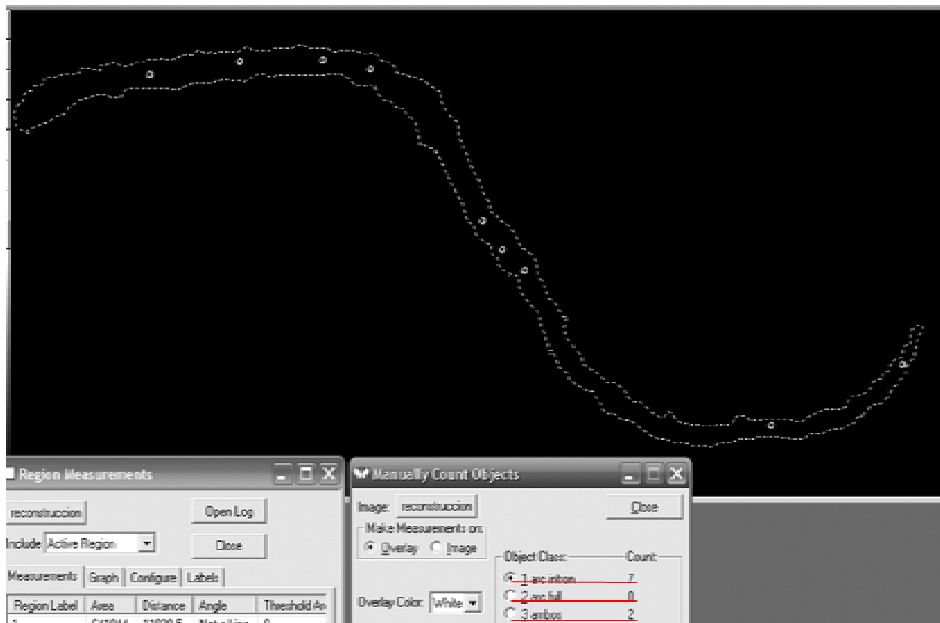


Figura 18. Ejemplo del análisis de una reconstrucción de un GD. Se incluye el conteo de células activas para cada condición: *Arc* intron, *Arc* citoplásmico (full) y ambos (subrayados en rojo). La imagen corresponde a un animal con actinomicina D sacrificado 8 horas después.

En la Figura 18

se observa un archivo del programa Metamorph, donde se ejemplifica cómo se obtienen los conteos. El área punteada, en el centro de la imagen, es el perímetro de la región analizada; los círculos dentro de ésta, son los sitios en de donde se identificó la célula activada, (pueden estar en ese plano o en otros más o menos profundos). Finalmente, los 2 recuadros inferiores que componen la imagen, son los datos que el software proporciona, como es la medición de área y los conteos para cada condición de actividad: Arc sólo en el núcleo (arc intrón), Arc sólo en citoplasma (arc full) y la superposición de ambos (ambos), los cuales están subrayados en color rojo.

En la Figura 19 observamos otro archivo de Metamorph, con los conteos de un animal que recibió vehículo y fue sacrificado 8 horas después. Podemos observar que el total de células que se activaron suma 40 (2 *arc* intrón, 17 *arc* full y 21 ambos); mientras que en el caso de la figura 19 que muestra la misma temporalidad en el procedimiento, sólo que con actinomicina D, el total de células activas es de 9. Podemos notar una expresión diferencial de *Arc* entre los diferentes tratamientos.

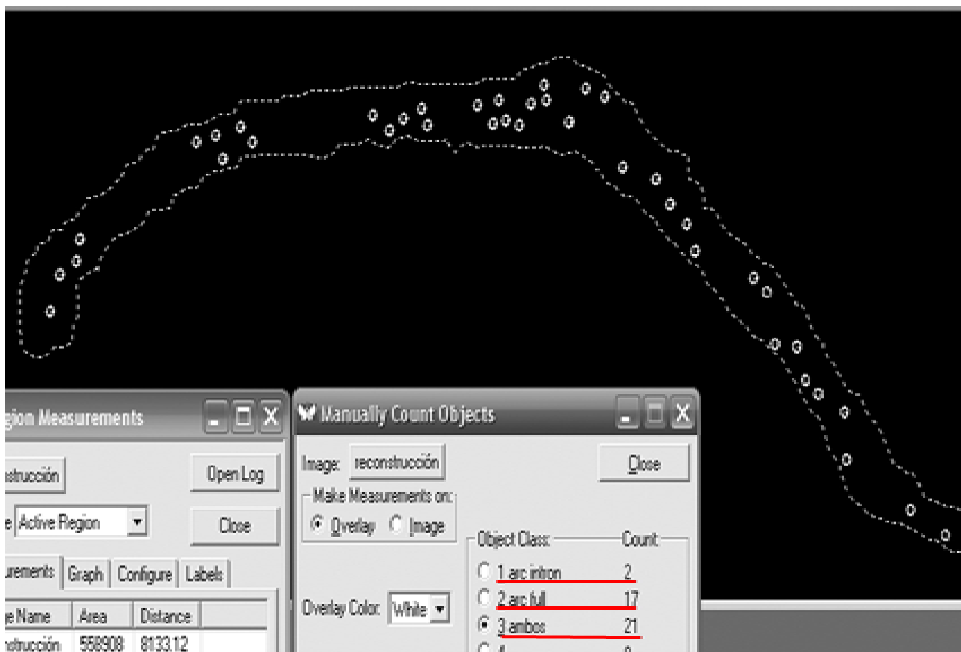


Figura 19. Ejemplo del análisis de una reconstrucción de un GD. Se incluye el conteo de células activas para cada condición: *Arc* nuclear, *Arc* citoplásmico y ambos (subrayados en rojo). La imagen corresponde a un animal con vehículo sacrificado 8 horas después.

En los análisis estadísticos pudimos constatar las diferencias observadas en los conteos para los diferentes grupos. El análisis de actividad total de *Arc* incluye a todas las células que presentaron transcripción de *Arc*, ya sea intrón, citoplásmico o ambos, para cada

condición experimental En este análisis se encontraron diferencias significativas con el ANOVA ($F_{7,8} = 36.987$ $p < 0.0001$). En la Figura 20 se presenta la gráfica donde se observa que todos los grupos que recibieron vehículo se comportaron de forma similar al grupo control que sólo exploró (proporción de actividad por arriba del 1.75%). Cabe notar que también el grupo que recibió actinomicina D sacrificado a los 30 minutos mostró una proporción cercana al 1.75%, sin embargo, en la Figura 21 se observa en detalle el tipo de actividad que presenta este grupo (sólo transcrito tardío y no transcripción *de novo*). En esta misma Figura, podemos observar que los grupos que recibieron actinomicina D ya sea 2 u 8 horas antes del sacrificio, detuvieron significativamente su transcripción, llegando a niveles muy similares a los del grupo control intacto (cerca al 4%).

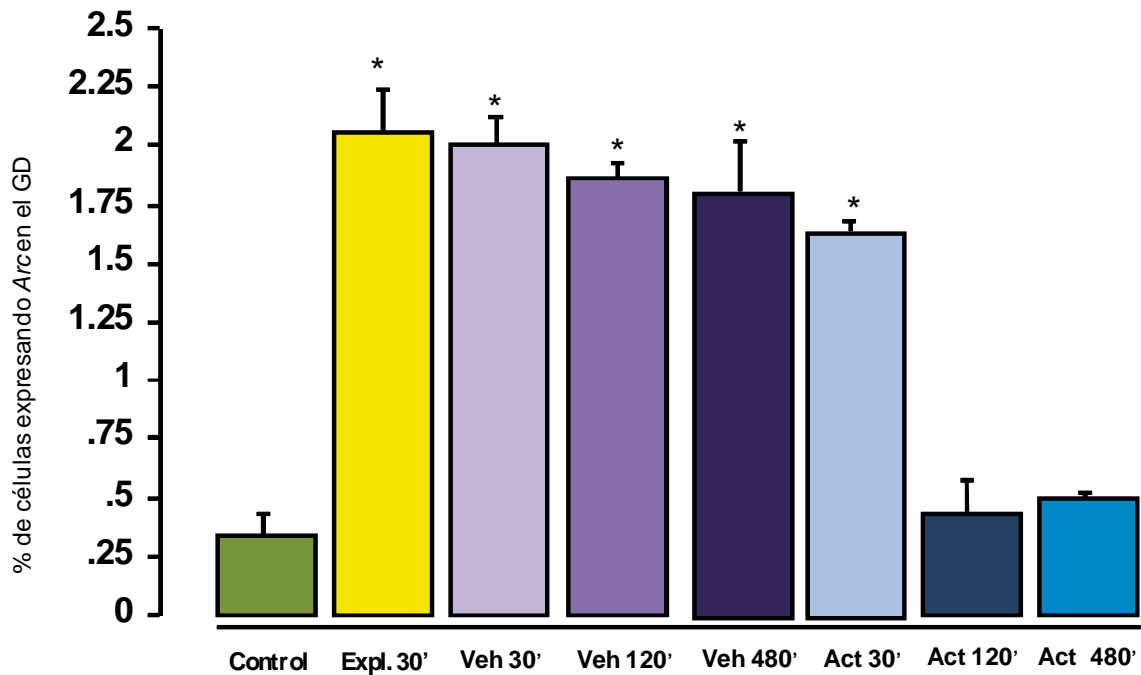


Figura 20. Distribución de los porcentajes de células *Arc* positivas en los diferentes grupos experimentales. Se puede observar que la expresión de actividad de los grupos con vehículo (cerca al 1.8%) son muy similares a los del grupo control que recibió estimulación conductual (amarillo), mientras que en los grupos con actinomicina D, todos muestran niveles más similares (cerca al 3.5%) al control sin estimulación conductual (verde). De manera particular podemos ver en el grupo con actinomicina D sacrificado 30 minutos después, muestra niveles de actividad parecidos al control con exploración.

Los siguientes análisis se realizaron separando cada tipo de transcripción de *Arc* (ver método de cuantificación), es decir, el transcrito intrónico, citoplasmático o ambos, para cada condición experimental. El primer análisis refiere al ANOVA realizado para

las comparaciones en la expresión únicamente de *Arc* intrónico, donde no se encontraron diferencias significativas entre ningún grupo (Figura 21 en la columna A). Esto indica que la identificación del intrón de *Arc* solo, no cambia en las diferentes condiciones experimentales.

El siguiente análisis fue el de la proporción de células que presentaron sólo *Arc* citoplásmico (columna B de la Figura 21), en el cual se encontraron diferencias significativas con el ANOVA ($F_{7,8} = 36.554$ $p < 0.0001$). Todos los grupos que recibieron vehículo fueron diferentes del grupo control intacto (porcentajes arriba del .7%), lo que se comprobó con el análisis post hoc con la prueba de Bonferroni, la cual mostró diferencias por debajo del criterio de $p < 0.0001$ en los grupos con vehículo de 30 minutos y 8 horas; mientras que para el grupo con vehículo de 2 horas hubo diferencias con el criterio de $p < 0.0002$. En el caso del control intacto y el control con exploración (sin ningún tipo de tratamiento) también se encontraron diferencias significativas ($p < 0.0002$). De igual forma, los grupos que recibieron actinomicina 2 y 8 horas antes del sacrificio presentaron muy poca actividad, por lo que en el análisis estadístico no resultaron diferentes al compararlos con el control intacto, pero sí cuando se compararon con el control que exploró. En el caso del grupo que recibió actinomicina D 30 minutos antes del sacrificio, la expresión de *Arc* en el citoplasma es muy cercana a los grupos con vehículo, esto indica que la transcripción que se inició durante la exploración pudo translocarse al citoplasma, coincidiendo con datos previos que indican que este proceso toma aproximadamente 30 minutos (Vazdarjanova et al. 2004).

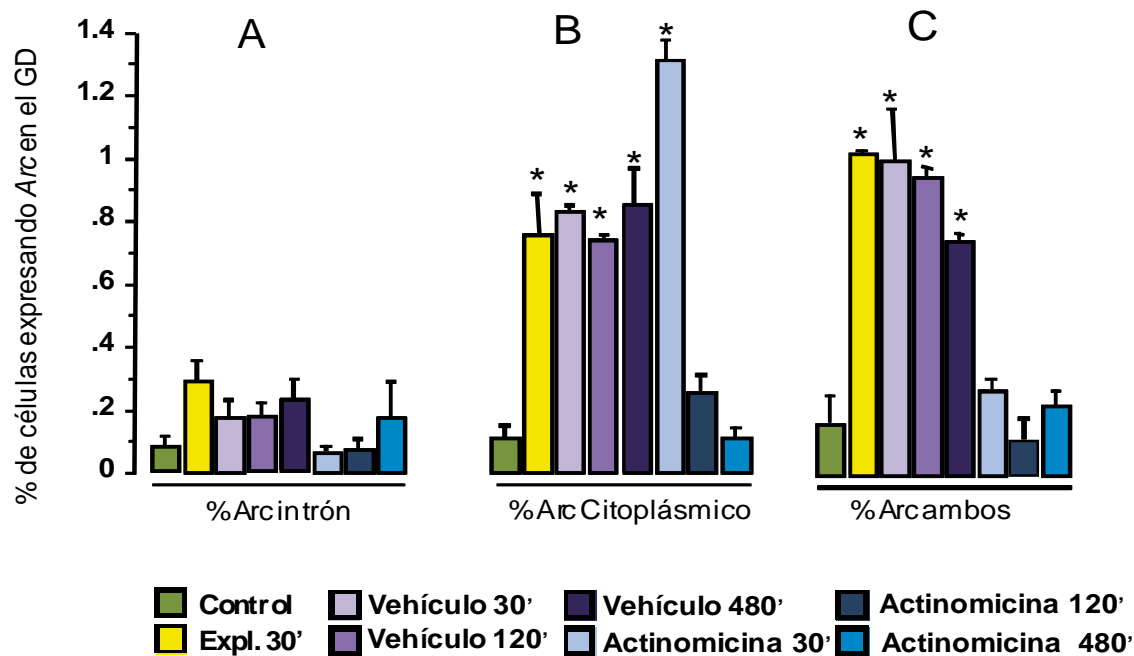


Figura 21. Distribución de los porcentajes de células *Arc* positivas en los diferentes tiempos de sacrificio y tratamientos. En la columna A se presenta el análisis para la expresión de *Arc* intrónico, en la columna B se muestran las proporciones para *Arc* citoplásmico y en la columna C se presentan los datos para las células que presentaron ambos transcritos. En A no se observan diferencias significativas entre los grupos; en B se encontraron diferencias para los grupos con vehículo, actinomicina 30 minutos y el control con exploración, en comparación con el control; en C sólo los grupos con vehículo y el control con exploración fueron distintos del control.

Finalmente, en el ANOVA para las células que presentaron simultáneamente *Arc* intrón y *Arc* citoplásmico (transcrito reciente y transcrito tardío, respectivamente), sólo se encontraron diferencias significativas ($F_{7,8} = 31.919$ $p < 0.0001$) entre los grupos que recibieron vehículo y en el control con exploración, en comparación con el grupo control intacto, todas por debajo del criterio de $p < 0.0001$ (post hoc con Bonferroni). En la Figura 21 (columna C) se puede apreciar la distribución de los niveles de actividad para cada condición, siendo muy evidente que los grupos con actinomicina D se comportaron como el control intacto (actividad por debajo del .3%). El grupo que recibió actinomicina D 30 minutos antes del sacrificio no es diferente del grupo control intacto, a diferencia del análisis anterior (sólo actividad citoplásmica), donde este mismo grupo mostraba actividad similar a la de los vehículos. Esto indica que si bien 30 minutos fueron

suficientes para permitir que el transcrito que se indujo durante la conducta se translocara al citoplasma, la actinomicina D impidió efectivamente que la transcripción iniciara de nuevo. En este último análisis se refleja, nuevamente, que las comparaciones del control con actividad y los grupos con actinomicina D muestran diferencias estadísticas significativas (todas por debajo de $p < 0.0001$, por lo que sirvió de manera efectiva agregar un grupo control que únicamente recibiera la estimulación conductual sin ningún tratamiento, con la finalidad de comparar la expresión basal del gen con aquellas que recibieron vehículo o actinomicina D.

DISCUSIÓN

Acorde con nuestros resultados, podemos resumir los aportes de este trabajo en tres apartados: 1) corroborar el efecto de la actinomicina D como un inhibidor del inicio del mecanismo transcripcional en las células granulares del giro dentado; 2) el efecto de la actinomicina D en el mecanismo de transcripción sostenida del gen *Arc* y 3) las posibles implicaciones teóricas de los resultados.

El primer apartado involucró el diseño de una estrategia farmacológica para inhibir la transcripción del gen *Arc* en el hipocampo. La estrategia se fue desarrollando paulatinamente; en un inicio, la administración fue intraperitoneal y con dosis altas (3.5 mg en 1 ml) debido a la vía, pero en los resultados no se observó inhibición transcripcional, esto es, en los tiempos y con las dosis administradas, no se observó una inhibición significativa de la transcripción de *Arc* en el hipocampo (resultados piloto 1). Por lo que dedujimos que si la actinomicina D efectivamente puede bloquear la transcripción administrada intraperitonealmente, las dosis deben ser más altas, o tal vez el tiempo de administración debiera de ser mayor, y probablemente el tiempo en el que se establece el efecto vía sistémica también sea más largo. Una vez que probamos la cirugía

para canular e infundir solución en el ventrículo lateral (resultados piloto 2), obtuvimos un primer diseño que incluyó grupos de animales a los que se les administró actinomicina D antes de explorar (15 ó 60 minutos) o después de explorar (inmediatamente después). Con los conteos de este diseño (piloto 3), delimitamos los puntos temporales en los que se nos permitiría administrar el fármaco y obtener un efecto.

Para concluir este apartado, que incluyó los pilotos 1, 2 y 3, así como el experimento 1; podemos decir que la administración intraventricular de actinomicina D, bajo las condiciones experimentales descritas en este trabajo, es efectiva, ejerciendo su acción como inhibidor del mecanismo de transcripción del gen *Arc* en las células granulares del giro dentado y en las células piramidales del cuerno de Ammón 1 (CA1). La inhibición inducida por este fármaco fue consistente en diferentes puntos temporales en los que se administró, y dicho efecto se manifestó en porcentajes estadísticamente significativos en comparación con el grupo que recibió vehículo. Cuando la actinomicina D se administró 15 minutos antes del inicio de la transcripción del gen, como resultado de la exploración del ambiente novedoso, logró inhibir el inicio de la transcripción de *Arc*. Lo anterior nos indica que el efecto inhibitorio es significativo estadísticamente, desde los 15 minutos después de haberse aplicado. Sin embargo, el efecto más pronunciado se presenta a la hora de haberse administrado, que al parecer es el pico máximo de inhibición transcripcional según otros reportes (Manahan-Vaughan et al. 2000; Otani et al. 1989), y que se reproduce en este trabajo como puede apreciarse en la Figura 14, donde se muestra que la proporción de actividad en CA1, para este grupo (menor al 3%), se asemeja a los niveles de expresión del control (2.5%). Finalmente, cuando la administración fue 2 horas antes de la exploración se obtuvo un porcentaje de actividad disminuido significativamente con relación al que recibió vehículo (<14% y >28%, respectivamente), aunque mayor que en los dos casos anteriores con actinomicina D (15 minutos y 1 hora), por lo que podemos inferir que el efecto inhibitorio de la actinomicina D persiste por al menos 2 horas a partir de su administración, impidiendo de manera significativa el inicio del mecanismo de transcripción. Con todo lo anterior, pudimos delimitar una ventana temporal del efecto inhibitorio la actinomicina D.

El segundo apartado, cuyo objetivo fue el comprobar farmacológicamente que la detección de *Arc* en las células granulares del giro dentado, hasta 8 horas después de la exploración espacial de un ambiente novedoso, se debe a la transcripción sostenida del gen.

En experimentos previos encontramos en más del 50% de las ratas transcrito reciente de *Arc*, aun cuando fueron sacrificados 8 horas después de la exploración. Lo anterior constituyó nuestra primera pista para sugerir que este gen reinicia su transcripción de manera repetida a lo largo de 8 horas (Angulo-Perkins, 2007; Ramírez- Amaya et al. 2005). Podemos afirmar con los datos que se expusieron en la Figura 20 y la Figura 21, donde se aprecian los porcentajes de expresión de *Arc* en los grupos que recibieron tratamiento con actinomicina D, que la transcripción sostenida de *Arc* está notablemente abatida, exceptuando el grupo que la recibió 30 minutos antes del sacrificio (Figura 21 columna B).

Este grupo de 30 minutos con actinomicina D es un resultado sumamente importante, nótese que en la columna A de la Figura 21, observamos que todos los grupos muestran muy pocas células que presentan sólo *Arc* en el núcleo (porcentajes abajo del 3%), y ninguno es diferente estadísticamente del control intacto. Ese resultado es consistente con datos nuestros anteriores (Angulo-Perkins, 2007), donde sólo cuando se sacrificó al animal 5 minutos después de haber explorado, las proporciones de *Arc* en el núcleo son diferentes estadísticamente de un control intacto, puesto que a los 30 minutos el ARNm ya se ha trasladado al citoplasma de la célula. Por lo anterior, no hay ninguna novedad en que no encontremos altos porcentajes de ARN en el núcleo. Pero, en la columna B (Figura 21) en la que se agrupan los porcentajes de células que presentan sólo en ARNm maduro (en citoplasma), observamos que ese grupo se comporta como los que recibieron vehículo o como el control con exploración. Podríamos pensar que la actinomicina D no es efectiva a ese tiempo (a pesar de que los resultados del experimento 1 nos indicaron que desde los 15 minutos es capaz de inhibir el inicio de la transcripción). Sin embargo, lo interesante se presenta en la columna C (Figura 21), donde todos los grupos con vehículo así como el control con exploración presentan una proporción de células de 0.8 a 1 %, lo que no sucede para el grupo de actinomicina D sacrificado a los 30 minutos

(0.3%). Esto implica que el transcrito que se indujo durante la conducta, 30 minutos después ya se había trasladado al citoplasma, pero dada la presencia de la actinomicina D, la transcripción ya no inició nuevamente. Entonces, podemos concluir que la actinomicina D si inhibe la transcripción (como observamos en el experimento 1) desde los 30 minutos. Ningún análisis hecho para ese punto temporal presentó transcrito reciente en el núcleo, (condición de la columna A para sólo nuclear y columna C para ambos transcritos); y lo que observamos en la columna B es la proporción de células que alcanzaron a iniciar la transcripción del gen (la cual coincide con la proporción de células activadas para el resto de los grupos con actividad), inmediatamente después de explorar y que pasados 30 minutos el ARNm ya se encontraba en el citoplasma. Por la misma razón ese grupo ya no muestra transcripción *de novo*, dado que la actinomicina está ejerciendo su efecto, es por eso que este grupo es en sí mismo una comprobación de que una vez administrada la droga, ésta es capaz de detener el mecanismo de transcripción sostenida.

Otro hallazgo importante que obtuvimos fue con el grupo que se sacrificó 8 horas después de haber explorado y que recibió actinomicina D; en ese caso (Figura 21), la transcripción del gen está abatida a niveles casi basales (control intacto < .5%), lo cual no se observó en el grupo con las mismas condiciones temporales pero que recibió vehículo, en el cual el porcentaje de células activas es de ~1.75 (Figura 20), lo que resultó semejante a lo que se ha reportado en otros trabajos (Chawla et al. 2005; Ramírez-Amaya et al. 2005; Rosi et al. 2005). Este mismo grupo con actinomicina D, sacrificado 8 horas después de explorar, es uno de los grupos en los que se abatió significativamente la expresión de *Arc*, pero lo que no sabemos es si esa ausencia de actividad transcripcional de *Arc* se debe a que la actinomicina D sigue haciendo efecto o bien, las células no fueron capaces de reiniciar su transcripción una vez pasado el efecto de la droga. Saber la respuesta a este cuestionamiento nos proporcionaría información acerca de los mecanismos celulares que emergen en estas condiciones, es decir, en condiciones naturales en las que se detuviere la transcripción de *Arc* por algún agente; así podríamos saber si una vez detenido el mecanismo no es capaz de reiniciarse o bien, terminado el efecto de aquello que imposibilita la transcripción se retome nuevamente.

Con los datos que hasta ahora tenemos podríamos inferir que pasadas 2 horas la actinomicina D va perdiendo efectividad (Figura 14) para inhibir, aunque sigue siendo significativa estadísticamente. Pero si hipotetizamos que lo que vemos en la Figura 14 es el inicio de una tendencia (actinomicina 15 minutos, 1 hora y 2 horas antes) en la que conforme pasa el tiempo el efecto decae y los niveles de actividad van siendo más altos, esperaríamos encontrar que administrada 8 horas antes de la exploración no tendría ningún efecto, y que los datos que observamos en las Figuras 20 y 21 para el grupo experimental con actinomicina sacrificado 8 horas después de explorar, indicarían que la célula no reinicia el mecanismo de transcripción una vez suspendido en algún momento. Hasta ahora hemos discutido los resultados de los grupos con actinomicina, pero en el caso de los grupos con vehículo, podemos decir que funcionaron como controles de manera eficiente mostrando proporciones de actividad celular equiparables a las del grupo control con actividad, lo que nos constató que los efectos inhibitorios que observamos se debieron exclusivamente a la actinomicina D y no a la cirugía o a la infusión de solución en el ventrículo lateral derecho.

Para concluir, en el apartado 3 discutiremos las implicaciones teóricas del trabajo. Al corroborar que el mecanismo que permite que *Arc* se mantenga presente en las células granulares del giro dentado hasta por 8 horas, es la transcripción sostenida del gen, podríamos pensar que durante esa ventana temporal la red cortico-hipocampal pudiera estimular continuamente a las células granulares, aunque también podría deberse a un mecanismo autónomo de la célula, que involucre factores reguladores de la transcripción de *Arc*, los cuales funjan como un circuito cerrado que mantenga la transcripción repetidamente. Otra propuesta es la posibilidad de que la experiencia sea la que modifique la duración del mecanismo de transcripción *Arc* (sostenida o no), datos preliminares obtenidos en el laboratorio sugieren que la transcripción sostenida de *Arc* sólo se presenta ante la exploración de un ambiente novedoso y no de uno que sea familiar.

Basados en estos datos podemos decir que la permanencia prolongada de *Arc* puede ser importante para consolidar procesos plásticos en las dendritas (Bramham y Messaoudi,

2005); que impliquen que la expansión o reducción de esa ventana resulta en cambios plásticos a nivel postsináptico; más aun sabiendo que la homología con la proteínas F-actina y α -espectrina (Lyford et al. 1995), es alta, lo que implicaría que participa en modificaciones estructurales en las dendritas donde se aloja la proteína de *Arc*.

CONCLUSIONES

Los resultados de los experimentos realizados en este proyecto, podemos concluir que el gen efector de expresión inmediata *Arc*, se expresa en el giro dentado del hipocampo de la rata adulta hasta por 8 horas después de haberse inducido su expresión mediante la conducta de exploración de un ambiente novedoso.

La presencia del ARN intrónico de *Arc* en las mismas células que presentan *Arc* en el citoplasma, sugiere que las células que después de varias horas (hasta 8 horas) siguen expresando *Arc* en el núcleo (intrónico y por lo tanto reciente) como en el citoplasma, mantienen activos los mecanismos de transcripción de *Arc*.

El diseño experimental utilizado en este trabajo, permitió obtener evidencia farmacológica que confirma que la presencia de *Arc* en las células del giro dentado después de la exploración espacial, se debe a un mecanismo dependiente de la transcripción. La administración intracerebroventricular de *Arc* después de la exploración espacial, evitó que se observara la presencia de células con el ARNm de *Arc* 2 u 8 horas después de la exploración. En los animales sacrificados 30 minutos después de la exploración, con administración de actinomicina D inmediatamente después de la exploración, se observó la presencia de ARNm de *Arc* en el citoplasma; el cual se asocia a la actividad neuronal inducida por la exploración, pero no se observó transcrito reciente.

Estos datos permiten concluir contundentemente que la presencia de *Arc* en las células granulares, después de la exploración, se debe a un mecanismo de transcripción sostenida.

La administración del inhibidor transcripcional actinomicina D 15 minutos o 1 hora antes de la exploración espacial, inhibe notablemente la transcripción del gen (menos del 5% de las células de CA1). LO anterior contrasta con los porcentajes que se reportan en la literatura para los grupos controles (expresión de 30% - 40% de las células en la región de CA1). A las 2 horas, el transcrito de *Arc* se observa en aproximadamente el 13% de las

células, lo que sugiere que el efecto de la actinomicina D comienza a disiparse. Sin embargo, no sabemos si a las 8 horas el efecto de la actinomicina D ya se ha eliminado. Por lo anterior, no podemos concluir si la falta de expresión de *Arc* en (después de 8 horas), las ratas que recibieron actinomicina D y se sacrificaron inmediatamente después de la exploración, se debe a que la actinomicina D seguía afectando la transcripción o bien a que este fenómeno depende de mecanismos celulares.

Finalmente, estos datos generan un antecedente directo del estudio de las bases fisiológicas del procesamiento de la información espacial en el giro dentado del hipocampo; así como también de la caracterización de la expresión de *Arc* y de su posible papel en la estabilización de modificaciones plásticas y la consolidación de la memoria.

REFERENCIAS

- Abrous, D.N., Koehl, M., y Le Moal, M. (2005). Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev.* 85(2), 523-69.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., y Watson, J. (1994). *Molecular Biology of the Cell.* (3rd ed). New York: Freeman. pp.82-87.
- Angulo-Perkins, A.A. (2007). *Caracterización de la expresión sostenida de Arc como un evento relevante para la consolidación de la memoria espacial.* Facultad de Psicología, UNAM.
- Amaral, D.G., y Witter, M.P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience.* 31(3), 571-91.
- Barco, A., Bailey, C.H., y Kandel, E.R. (2006). Common molecular mechanisms in explicit and implicit memory. *J Neurochem.* 97 (6):1520-33.
- Barlow, H.B. (1972). Single units and sensation: a neuron doctrine for perceptual psychology? *Perception.* 1(4), 371-94.
- Bear, M.F., y Malenka, R.C. (1994). Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr. Opin. Neurobiol.* 4, 389-399.
- Bliss, T.V., y Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol.* 232(2), 331-56.
- Bramham, C.R., y Messaoudi, E. (2005). BDNF function in adult synaptic plasticity: The synaptic consolidation hypothesis. *Progress in Neurobiology.* 76, 99-125.
- Bramham, C.R., Worley, P.F., Moore, M.J., y Guzowski, J.F. (2008). The immediate early gene Arc/Arg 3.1: Regulation, Mechanisms, and Function. *J Neurosci.* 28(46), 11760-7.
- Cavazos, J.E., y Sutula, T.P. (1990). Progressive neuronal loss induced by kindling: a possible mechanism for mossy fiber synaptic reorganization and hippocampal sclerosis. *Brain Res.* 527(1), 1-6.
- Chklovskii, D.B., Mel, B.W., y Svoboda, K. (2004). Cortical rewiring and information storage. *Nature.* 431(7010), 782-8.
- Chawla, M.K., Guzowski, J.F., Ramirez-Amaya, V., Lipa, P., Hoffman, K.L., Marriott, L.K., Worley, P.F., McNaughton, B.L., y Barnes, C.A. (2005). Sparse, environmentally

selective expression of RNA in the upper blade of the rodent fascia dentata by brief spatial experience. *Hippocampus* 15, 579-586.

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

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

Fagni, L., Worley, P.F., y Ango, F. (2002). Homer as both a scaffold and transduction molecule. *Sci STKE.* (137).

Fields, R.D., Lee, P.R., y Cohen, J.E. (2005). Temporal integration of intracellular Ca²⁺ signaling networks in regulating gene expression by action potentials. *Cell Calcium.* 37(5), 433-42.

Gazzaniga, M.S. (2000). *The cognitive Neurosciences.* Cambridge, Mass: MIT Press. pp. 171-189

Guzowski, J.F., McNaughton, B.L., Barnes, C.A., y Worley, P.F. (1999). Environment-specific expression of the immediate-early gene *Arc* in hippocampal neuronal ensembles. *Nat Neurosci* 2:1120-4.

Guzowski, J.F., Lyford, G.L., Stevenson, G.D., Houston, F.P., McGaugh, J.L., Worley, P.F., y Barnes, C.A. (2000). Inhibition of activity-dependent *ARC* protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *J Neurosci.* 20, 3993-4001.

Hebb, D.O. (1949). *The organization of behavior; A neuropsychological theory.* New York: Wiley.

Hodges, A. (1984). *Allan Turing: The enigma of intelligence.* Nueva York: Touchtone.

Kandel, E., Schwartz, J.H., y Jessell, T.M. (2001). Principles of Neural Science. Nueva York: McGraw Hill. pp.1232-1237, 1254-1267 y 1264.

Kelleher, R.J. 3rd., Govindarajan, A., y Tonegawa, S. (2004). Translational Regulatory Mechanisms in Persistent Forms of Synaptic Plasticity. *Neuron.* 44, 59-73.

Lamprecht, R., y LeDoux, J. (2004). Structural plasticity and memory. *Nat Rev Neuroscience.* 5(1), 45-54.

Lanahan, A., y Worley, P. (1998). Immediate-early genes and synaptic function. *Neurobiol Learn Mem.* 70(1-2), 37-43.

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

Lyford, G.L., Yamagata, K., Kaufmann, W.E., Barnes, C.A., Sanders, J.K., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Lanahan, A.A., y Worley, P.F. (1995). *Arc*, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron*. 14, 433-45.

Manahan-Vaughan, D., Kulla, A., y Frey, U.J. (2000). Requirement of translation but not transcription for the maintenance of long-term depression in the CA1 region of freely moving rats. *J Neurosci*. 20 (22), 8572-8576.

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

McNaughton, B.L., Barnes, C.A., Gerrard, J.L., Gothard, K., Jung, N.W., Knierim, J.J., Kudrimoti, H., Qin, Y., Skaggs, W.E., Suster, M., y Weaver, K.L. (1996). Deciphering the hippocampal polyglot: the hippocampus as a path integration system. *J Exp Biol*. 199, 173-185.

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

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

Moser, M.B., 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91(26), 12673-5.

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

Nadel, L., y Eichenbaum, H. (1999). Introduction to the special issue on place cells. *Hippocampus*. 9 (4), 341.

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

O'Keefe, J. (1976). Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Exp Neurol*. 51(1), 78-109.

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

O'Keefe, J. (1999). Do hippocampal pyramidal cells signal non-spatial as well as spatial information? *Hippocampus* 9, 352-6

Otani, S., Marshall, C.J., Tate, W.P., Goddard, G.V., y Abraham, W.C. (1989). Maintenance of long-term potentiation in rat dentate gyrus requires protein synthesis but not messenger RNA synthesis immediately post-tetanzation. *Neuroscience*. 28(3), 519-26.

Paxinos, G., y Watson, C. (1998). *The rat brain in stereotaxic coordinates*, (4th ed.), San Diego: Academic Press.

Plath, N., Ohana, O., Dammermann, B., Errington, M.L., Schmitz, D., Gross, C., Mao, X., Engelsberg, A., Mahlke, C., Welzl, H., Kobalz, U., Stawrakakis, A., Fernandez, E., Waltereit, R., Bick-Sander, A., Therstappen, E., Cooke, S.F., Blanquet, V., Wurst, W., Salmen, B., Bosl, M.R., Lipp, H.P., Grant, S.G., Bliss, T.V., Wolfer, D.P., y Kuhl, D. (2006). Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. *Neuron*. 52(3), 437-44.

Ramirez-Amaya, V., Escobar, M.L., Chao, V., y Bermudez-Rattoni, F. (1999). Synaptogenesis of mossy fibers induced by spatial water maze overtraining. *Hippocampus*. 9(6), 631-6.

Ramírez-Amaya, V., Balderas, I., Sandoval, J., Escobar, M.L., y Bermúdez-Rattoni, F. (2001). Spatial long-term memory is related to mossy fiber synaptogenesis. *J Neurosci.* 21(18), 7340-8.

Ramírez-Amaya, V., Vazdarjanova, A., Mikhael, D., Rosi, S., Worley, P.F., Barnes, C.A. (2005). Spatial exploration-induced Arc mRNA and protein expression: evidence for selective, network-specific reactivation. *J Neurosci*. 25(7), 1761-68.

Ramirez-Amaya, V. (2007). Molecular Mechanisms of Synaptic Plasticity Underlying Long-Term Memory Formation En: *Neural Plasticity and Memory: From genes to brain imaging*. Ed. por Federico Bermudez-Rattoni. USA: Edit. Taylor & Francis Group. pp.47-59.

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

Shepherd, J.D., Rumbaugh, G., Wu, J., Chowdhury, S., Plath, N., Kuhl, D., Hugarir, R.L., y Worley, P.F.(2006). Arc/Arg3.1 mediates homeostatic synaptic scaling of AMPA receptors. *Neuron*. 52(3), 475-84.

Shors, T.J., Miesegaes, G., Beylin, A., Zhao, M., Rydel, T., y Gould, E. (2001). Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature*. 410(6826), 372-6.

Squire, L.R., y Cave, C.B. (1991). The hippocampus, memory, and space. *Hippocampus*. 1(3), 269-71.

Steward, O., y Schuman, E.M. (2003). Compartmentalized synthesis and degradation of proteins in neurons. *Neuron*. 40, 347-359.

Steward, O., Wallace, C.S., Lyford, G.L., y Worley, P.F. (1998). Synaptic activation causes the mRNA for the IEG *Arc* to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. *Neuron*. 21, 741-751.

Steward, O., y Worley, P.F.(2001). Selective targeting of newly synthesized *Arc* mRNA to active synapses requires NMDA receptor activation. *Neuron*. 30, 227-240.

Takemoto-Kimura, S., Worley, P.F., y Bito, H. (2009). Synaptic activity-responsive element in the *Arc/Arg3.1* promoter essential for synapse-to-nucleus signaling in activated neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106(1), 316-21.

Tolman, E.C. (1948). Cognitive maps in rats and men. *Psychol. Rev.* 55, 189– 208.

Toni, N., Buchs, P.A., Nikonenko, I., Bron, C.R., y Muller, D. (1999). LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. *Nature*. 402(6760), 421-5.

Vazdarjanova, A., McNaughton, B.L., Barnes, C.A., Worley, P.F., y Guzowski, J.F. (2002). Experience-dependent coincident expression of the effector immediate-early genes *Arc* and *Homer 1* and hippocampal and neocortical neuronal networks. *J Neurosci* 22, 10067-10071.

Vazdarjanova, A., y Guzowski, J.F. (2006). Differences in hippocampal neuronal population responses to modifications of an environmental context: evidence for distinct, yet complementary, functions of CA3 and CA1 ensembles. *J Neurosci*. 24(29), 6489-96.

Vazdarjanova, A., Ramirez-Amaya, V., Insel, N., Plummer, T.K., Rosi, S., Chowdhury, S., Mikhael, D., Worley, P.F., Guzowski, J.F., Barnes, C.A. (2006) Spatial exploration induces *ARC*, a plasticity-related immediate-early gene, only in calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-positive principal excitatory and inhibitory neurons of the rat forebrain. *J Comp Neurol*. 498(3), 317-29.

Waltereit, R., Dammermann, B., Wulff, P., Scafidi, J., Staubli, U., Kauselmann, G., Bundman, M., y Kuhl, D. (2001). *Arg3.1/Arc* mRNA induction by Ca^{2+} and cAMP requires protein kinase A and mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase activation. *J Neurosci*. 21(15), 5484-93.

Worley, P.F., Cole, A.J., Murphy, T.H., Christy, B.A., Nakabeppu, Y., y Baraban, J.M. (1990). Synaptic regulation of immediate-early genes in brain. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 55, 213-23.

Xavier, G.F., y Oliveira-Filho, F.J. (1999). Dentate gyrus-selective colchicine lesion and disruption of performance in spatial tasks: difficulties in "place strategy" because of a lack of flexibility in the use of environmental cues? *Hippocampus*. 9(6), 668-81

Zheng, F., Luo, Y., y Wang, H. (2009). Regulation of brain-derived neurotrophic factor-mediated transcription of the immediate early gene Arc by intracellular calcium and calmodulin. *J Neurosci Res*. 87(2), 380-92.

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1.....	Pág. 6
Figura 2.....	Pág. 8
Figura 3.....	Pág. 11
Figura 4.....	Pág. 13
Figura 5.....	Pág. 15
Figura 6.....	Pág. 18
Figura 7.....	Pág. 22
Figura 8.....	Pág. 24
Figura 9.....	Pág. 31
Figura 10.....	Pág. 32
Figura 11.....	Pág. 34
Figura 12.....	Pág. 36
Figura 13.....	Pág. 36
Figura 14.....	Pág. 37
Figura 15.....	Pág. 39
Figura 16.....	Pág. 39
Figura 17.....	Pág. 40
Figura 18.....	Pág. 40
Figura 19.....	Pág. 41
Figura 20.....	Pág. 42
Figura 21.....	Pág. 44
Tabla 1.....	Pág. 22
Tabla 2.....	Pág. 34

APÉNDICE

Cronograma de estimulación, tratamiento con actinomicina D y sacrificio del experimento1.

CRONOGRAMA DÍA 1				
RATA	Exploración	Tratamiento post Exploración	Intervalo	Sacrificio
401	11:00	11:12 Actinomicina D	8hr	7:05
417	11:20	11:27 Actinomicina D	8hr	7:25
411	11:39	11:46 Actinomicina D	2hr	1:44
402	11:54	12:00 Actinomicina D	2hr	1:59
416	12:21	12:26 Actinomicina D	30min	12:56
410	12:38	12:43 Actinomicina D	30min	1:13

Cronograma de estimulación, tratamiento con vehículo y sacrificio del grupo del experimento 2.

CRONOGRAMA DÍA 2

RATA	Exploración	Tratamiento post Exploración	Intervalo	Sacrificio
414	11:00	11:08 Vehículo	2hr	1:05
408	11:15	11:20 Vehículo	2hr	1:20
419	11:33	11:35 Vehículo	30min	12:08
405	11:46	11:50 Vehículo	30min	12:21
421	12:30	12:35 Vehículo	8hr	8:35
413	12:45	12:50 Vehículo	8hr	8:50

Cronograma de tratamiento, estimulación, y sacrificio del grupo del experimento número 2.

CRONOGRAMA DÍA 3				
RATA	Tratamiento pre Exploración	Intervalo	Exploración	Sacrificio
400	4:00 VEHÍCULO	2hr	6:05	6:10
404	4:32 Actinomicina D	2hr	6:37	6:42
418	4:41 Actinomicina D	2hr	6:46	6:51
406	4:53 Actinomicina D	1hr	5:58	6:03
409	5:01 Actinomicina D	1hr	6:11	6:16
412	5:09 Actinomicina D	30min	5:29	5:34
415	5:20 Actinomicina D	30min	5:40	4:45
420	7:15 VEHÍCULO	1hr	8:20	8:25
422	7:22	30hr	7:42	7:47

	VEHÍCULO			
--	----------	--	--	--