

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA



**CARACTERIZACIÓN ANATOMOFUNCIONAL DE LOS CIRCUITOS
DORSAL Y VENTRAL DE LA CORTEZA ESTRIADA (V1) DEL
PRIMATE UTILIZANDO catFISH**

Tesis que presenta:

Nissyen Yazmín Campuzano Contreras

como requisito para obtener el grado de
Maestra en Ciencias (Neurobiología)

Directores de Tesis: Dr. Hugo Merchant Nancy y Dr. Víctor Ramírez Amaya

Campus Juriquilla, Querétaro. Noviembre 2009.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RESUMEN

El sistema visual de los primates está integrado por dos grandes circuitos corticales de procesamiento de información: el circuito dorsal que incluye a las áreas mediales temporales (V5) y a la corteza parietal posterior, y el circuito ventral que incluye al área occipitotemporal (V4) y a las áreas inferotemporales. El circuito ventral se encarga de representar información asociada con la identidad del estímulo visual (el qué), mientras que el circuito dorsal procesa la información de la ubicación del estímulo así como su movimiento (el dónde). El objetivo del presente trabajo es determinar el nivel de independencia y de sobre lapa funcional de los circuitos dorsal y ventral empezando en corteza visual primaria (V1) hasta V4 y V5. Con este fin, se utilizó la técnica de catFISH o *análisis compartamental de la actividad neuronal utilizando histología fluorescente*, que permite medir el historial de activación de redes neuronales en dos épocas distintas de estimulación. Debido a la dinámica de expresión y distribución del Gen Arc, catFISH permite cuantificar el número de neuronas que se activaron 5 y/o 20 minutos después de dos periodos independientes de estimulación. Se presentaron dos tipos diferentes de estímulos visuales en un sólo ojo de un mono verde (*Chlorocebus pygerythrus*). El primer estímulo se presentó por 3 minutos y fue la figura de un caballo corriendo (24° de campo visual). Treinta minutos después se presentó un segundo estímulo que genera un flujo óptico espacial en movimiento. Después de los 3 minutos del segundo estímulo se extrajeron los lóbulos occipital, parietal y temporal del animal y fueron congelados. Los resultados principales de la cuantificación de la expresión de Arc por hibridación *in situ* son: (1) V1 mostro un 39% de neuronas que se activaron en ambos periodos de estimulación visual, (2) V4, nodo asociado al circuito ventral, mostro el más alto porcentaje (48%) de neuronas que se activaron exclusivamente durante la presentación de la figura del caballo y, (3) el mayor porcentaje (36%) de neuronas en V5 sólo se activaron en relación al estímulo de flujo óptico. Estos resultados ratifican la independencia del flujo de información visual en relación al qué y al donde desde V4 y V5, respectivamente.

SUMMARY

The primate visual system is formed by two major pathways of information processing: the dorsal pathway, which includes the temporal and medial areas (V5) as well as the posterior parietal cortex; and the ventral pathway which consists of the occipitotemporal area (V4) and the inferotemporal areas. The ventral pathway processes information regarding the identity of a visual stimulus (i.e. the ¿What?), while the dorsal pathway decodes input related to stimulus location and movement (i.e. the ¿Where?). The object of the present work is to determine the degree of functional overlap and autonomy of each pathway, starting with the primary visual cortex (V1) up to V4 and V5. The chosen method for this experiment was catFISH (*Cellular Compartment Analysis of Temporal Activity by Fluorescence In Situ Hybridization*), which allows us to determine the history of neural network activation in two separate stimulation sessions. Due to the distribution and expression dynamics of Arc gene, catFISH can be used to quantify the number of neurons which were activated 5 and/or 20 minutes after two independent stimulation periods. Two different types of visual stimuli were presented to a monocularly deprived green monkey (*chlorocebus pygerythrus*). The first stimulus was shown for 3 minutes and consisted of an animation of a horse running (24° of visual field). Thirty minutes later, a second stimulus was shown, which generates a moving optic flow. Three minutes after the second stimulation session, the occipital, parietal and temporal lobes of the subject were extracted and frozen. The major results of the quantitative analysis of gene expression using in-situ hybridization are as follows: (1) V1 shows 39% of neurons activated by both stimulation periods, (2) V4, which is a node associated with the ventral pathway, presents the highest percentage (48%) of neurons activated exclusively during the exposure of the horse's image, and (3) the highest percentage (36%) of neurons in V5 were only activated during the optic flow stimulus. These results corroborate the segregation of visual information flow related to What? and Where? from V4 and V5 respectively.

Agradecimientos a:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
Becario No: 10830, proyectos 51028 y 53944

Trabajo auspiciado por PAPIIT-IN213907 y DGAPAIN-213909

A las unidades de apoyo académico:

- Microscopia Electrónica- Confocal
Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos

- Biblioteca
M.V.Z. Román Pacheco Barrita (Jefe de Biblioteca)
Lic. Teresa Soledad Medina Malagón
Lic. Rafael Silva Cruz
Lic. Teresita de Jesús Pérez Cruz

- Biología Molecular
Dra. Anaid Antaramian Salas
M. en C. Adriana González Gallardo

- Enseñanza
M. en C. Leonor Casanova Rico

A los que se involucraron en el proyecto ayudando al desarrollo del mismo:

Especialmente a M. en C. Itzel Ricaño Cornejo por todo su apoyo y guía sin la cual no hubiese sido posible este trabajo.

Ing. Luis Prado Loeza, Raúl Paulín Pineda y Cutberto Dorado Mendieta por su apoyo técnico.

Dr. Ataúlfo Martínez Torres por todas sus asesorías en biología molecular y préstamos de reactivos para el desarrollo de la sonda de Arc en mono.

Dr. Miguel Condés Lara por su colaboración en el experimento con choques electroconvulsivos.

Dr. Alfredo Varela Echavarría por proporcionarnos materiales y reactivos.

Dr. Andrés Quintanar Stephano por la donación de reactivos y asesoría en cirugía.

Dra. Teresa Edith Garay Rojas por sus asesorías en biología molecular.

ÍNDICE

| | | |
|--|----|-----|
| Resumen español | pp | iii |
| Resumen inglés | pp | iv |
| Introducción | pp | 1 |
| Antecedentes | pp | 3 |
| 1. Anatomía de V1 | pp | 3 |
| 2. Citoarquitectura de V1 | pp | 4 |
| 3. Proyecciones subcorticales | pp | 6 |
| 3.1 Campo visual | pp | 6 |
| 3.2 Células ganglionares | pp | 7 |
| 3.3 Nervio óptico | pp | 7 |
| 3.4 Núcleo Geniculado lateral | pp | 8 |
| 3.5 Capas magnocelular y parvocelular | pp | 8 |
| 3.6 Radiaciones ópticas | pp | 9 |
| 4. Organización funcional | pp | 11 |
| 5. Proyecciones corticales | pp | 14 |
| 6. Vías de procesamiento de información | pp | 17 |
| 7. Las células de V5 responden al movimiento | pp | 21 |
| 8. Las células de V4 responden a la forma | pp | 24 |
| 9. catFISH: Una herramienta para el análisis de la actividad en ensamblajes neuronales con excelente resolución anatómica | pp | 28 |
| Hipótesis | pp | 32 |
| Objetivo General | pp | 32 |
| Objetivos Específicos | pp | 32 |
| Método | pp | 34 |
| a) Sujetos | pp | 34 |
| b) Preparación del animal | pp | 33 |
| c) Procedimiento de estimulación | pp | 34 |
| d) Obtención y procesamiento del tejido | pp | 38 |
| e) Hibridación in situ fluorescente | pp | 39 |
| f) Microscopía | pp | 41 |
| g) Análisis de imágenes | pp | 42 |

| | | |
|--|----|----|
| Resultados | pp | 43 |
| a) Diseño de sonda | pp | 43 |
| b) Estandarización de catFISH | pp | 55 |
| c) Cinética compartamental de Arc en mono | pp | 58 |
| d) Densitometría | pp | 60 |
| e) Conteo celular | pp | 62 |
| Discusión | pp | 65 |
| Conclusiones | pp | 77 |
| Referencias | pp | 78 |
| Lista de figuras y tablas | pp | 83 |
| Apéndices | pp | 85 |
| I. Hibridación in situ fluorescente | pp | 85 |
| II. Transcripción de ARN | pp | 86 |
| III. Elaboración de sonda | pp | 88 |
| IV. Protocolo para cirugía y estimulación | pp | 94 |
| V. Protocolo in situ | pp | 96 |

INTRODUCCIÓN

La corteza cerebral es la región del sistema nervioso central donde se realiza la integración de información asociada a conductas altamente complejas, incluyendo la percepción, la memoria, la abstracción y el control de la conducta voluntaria. En los seres humanos presenta una gran cantidad de circunvoluciones, lo que aumenta en forma considerable su superficie, y confiere una gran capacidad para procesar información y generar conductas diversas. Para comprender integralmente la función del sistema nervioso del ser humano es necesario el estudio de modelos animales complejos y filogenéticamente cercanos a éste, como es el caso de los primates no-humanos.

El interés principal del presente trabajo, que se centra en la corteza visual, es localizar, cuantificar y caracterizar funcionalmente las unidades neuronales que responden a dos tipos de estímulos visuales (objeto vs espacio) con el propósito de contribuir a el entendimiento de un problema clásico del procesamiento de información visual, en el que se han distinguido dos sistemas: el que resuelve la ubicación espacial del estímulo, y el que procesa su identidad. Para entender en detalle este problema describiremos las características anatómicas y funcionales de la corteza visual.

La corteza cerebral abarca un área aproximada de $12,000 \text{ mm}^2$, de los cuales $10,000 \text{ mm}^2$ son neocorteza representando el 94% y de esa porción, $5,500 \text{ mm}^2$ que representa el 55% es corteza visual. El área V1 es la más grande con una superficie de 1200 mm^2 es decir el 12%

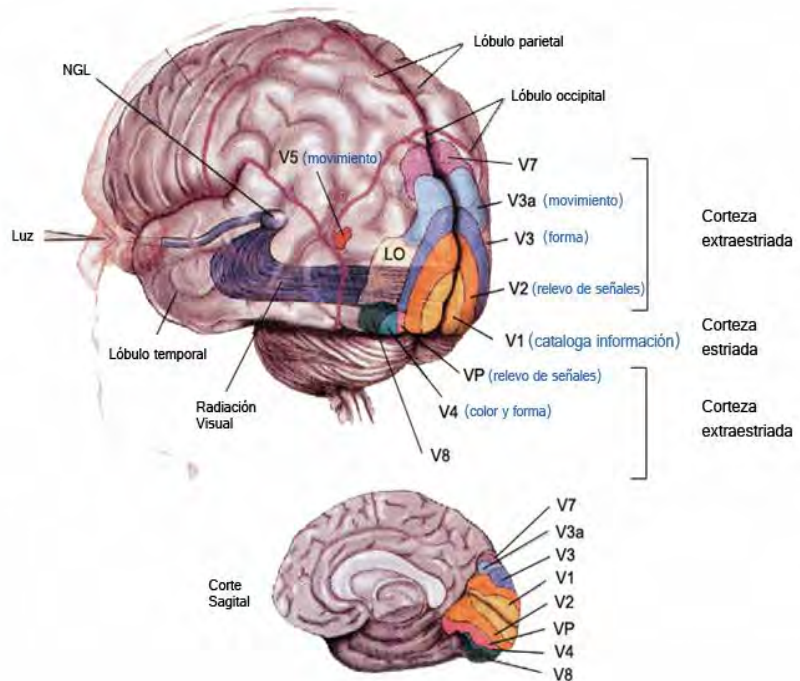


FIGURA 1. Sistema visual. Se muestra la ruta que sigue la información visual desde que entra por la retina hasta llegar a las diferentes cortezas visuales de especialización funcional. Esquema modificado de Logothetis (1999).

(Felleman y Van Essen, 1991). Lo que nos hace una especie particularmente visual al igual que los demás primates (ver fig. 1).

Como se muestra en la figura 1, la información visual captada por la retina viaja por el nervio óptico hasta el cuerpo geniculado lateral, en el tálamo, y de ahí a la corteza visual primaria, siendo ésta el primer relevo de información en la corteza cerebral. A partir de V1 la información es repartida a distintas áreas visuales de asociación, denominadas extraestriatales como V2, V3, V4, V5, etc (Zeki, 1993).

Por la complejidad del sistema visual se necesita una herramienta capaz de mostrar tanto anatomía, citoarquitectura y fisiología conjuntamente para poder integrar la información dentro de un modelo que explique al sistema funcional completo. Una herramienta ideal para comprender las bases celulares de la cognición sería una que brindara muy buena resolución celular para las respuestas de todas las neuronas del cerebro en tiempo real.

Actualmente la detección de la expresión de los llamados *genes de expresión inmediata temprana* (GEIT) después de la estimulación sensorial nos brinda un método de estudio de la actividad neuronal con resolución temporal en el orden de minutos y una resolución celular con capacidad de distinguir con certeza las unidades neuronales activas. Se le conoce a esta técnica como catFISH o *análisis compartamental de la actividad neuronal utilizando histología fluorescente* (Guzowski, et al., 1999). Este método nos da información sobre la historia de actividad de células nerviosas a lo largo de todo el encéfalo. Da indicio del momento en el que se activaron determinadas neuronas y permite la visualización, dentro del mismo cerebro, de poblaciones neuronales involucradas en dos experiencias conductuales distintas (Guzowski et al., 1999; Waltereit et al., 2001; Vardasjanova et al., 2002; Vardasjanova y Guzowski, 2004).

Es por ello que el primer objetivo del presente trabajo fue, estandarizar la técnica de catFISH en tejido de mono y caracterizar la cinética compartamental de Arc, la cual resultó ser similar a la reportada para rata, es decir a los ~ 5 minutos en núcleo y a los ~ 20 en citoplasma (Guzowski et al., 1999; Vardasjanova et al., 2002; Vardasjanova y Guzowski, 2004).

El segundo objetivo fue demostrar que cat-FISH es una técnica excelente para observar la segregación funcional de los circuitos ventral y dorsal de la vía visual. Para ello le presentamos a

un mono dos estímulos iguales en brillo, contraste, color, textura y velocidad, pero diferentes en movimiento, el estímulo 1 generaba la silueta de un caballo y 20 minutos después se presentaba el estímulo 2 el cual generaba un flujo espacial. Los resultados obtenidos mostraron activación cortical diferencial asociada a cada estimulación.

Se encontró señal de Arc citoplasmático, es decir, activación ante el primer estímulo en V4, nodo cortical asociado a la vía del *qué* (Ungerleider y Mishkin, 1982). En V5 el mayor porcentaje de células Arc positivas fue nuclear, tinción asociada al segundo estímulo del *dónde* (Ungerleider y Mishkin, 1982). Y en V1 células con doble tinción, es decir, se activaron ante ambos estímulos, estos resultados confirmaron nuestras hipótesis las cuales pronosticaban una gran coactivación de Arc en V1 y una segregación funcional en V4 y V5.

Planteamiento del problema

catFISH, brinda una oportunidad única y sin precedentes para examinar cuáles y qué tipo de células se activan dependiendo de las características físicas y espaciales del estímulo, permitiéndonos distinguir cuándo, cuánto y dónde divergen las dos vías de procesamiento visual. Así pues se podrá identificar de una sola mirada y con la mejor precisión anatómica posible las neuronas de V1 implicadas que se activan por estímulos visuales.

El método histológico de catFISH se ha desarrollado precisamente para complementar datos electrofisiológicos y proveer la posibilidad de realizar un mapeo anatómico detallado y completo de la actividad neuronal relacionada a la conducta. Por lo tanto, obtendremos un panorama integral de la ruta que sigue la información visual en el primate, encontrando Arc citoplásmico en células activadas por un primer estímulo con características psicofísicas del “qué” y Arc nuclear en células que respondan a características espaciales del “dónde”. Y la colocalización indicará los sitios que se activaron ante ambas características, dado que V1 es el centro repartidor de la información visual que proyecta hacia la vía temporo-occipital, o bien, hacia la parieto-occipital; se espera encontrar una alta colocalización.

ANTECEDENTES

1. ANATOMÍA DE V1

Las áreas corticales visuales están concentradas en el lóbulo occipital. La corteza visual primaria, que recibe la mayoría de los axones del núcleo geniculado lateral, se encuentra en ambos labios del surco calcarino del lóbulo occipital. El labio superior del surco calcarino, en la *cuña*, recibe información de la parte inferior de los hemisferios contralaterales, mientras que su labio inferior, en la *circunvolución lingual*, la recibe de la parte superior de los hemisferios. Como se ha dicho previamente, la *parte central* del campo visual está representada en la porción de corteza visual primaria más cercana al polo occipital, y las regiones más periféricas lo están en niveles más rostrales de la cuña y de la circunvolución lingual. Los 10 grados centrales del campo visual ocupan aproximadamente la mitad de la corteza visual.

La neocorteza está formada por seis capas horizontales, V1 se caracteriza por una ancha capa IV. Esta capa contiene una banda adicional de fibras mielínicas, la *estria de Gennari*, que explica su denominación de *corteza estriada* (ver figura 3 y 4), y revela la gran proyección de retroalimentación geniculocalcarina convirtiéndola en el sitio principal de proyecciones aferentes (entrada de información perceptual).

La corteza visual está organizada verticalmente en un conjunto complejo de

columnas corticales que se extienden perpendicularmente desde la superficie de la piamadre hasta la sustancia blanca (ver figura 2), conteniendo la dominancia ocular y la

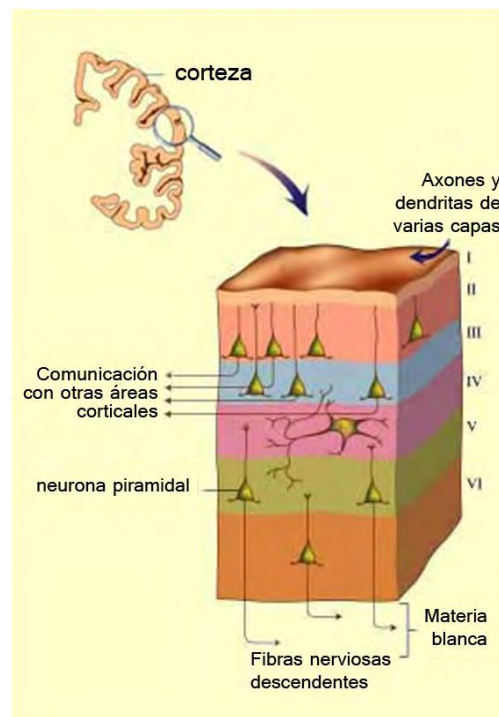


FIGURA 2. Capas en V1. En la corteza visual, los cuerpos celulares de las neuronas se dividen en seis capas que componen la neocorteza del primate. Es materia gris de ~2 mm de espesor, las cuatro capas se numeran de I a VI, comenzando desde la capa que se encuentra en contacto con las meninges. Cada capa se distingue tanto por el tipo de neuronas que contiene y por las conexiones que hace con otras áreas del cerebro. Modificado de Dubuc (2002).

preferencia de orientación, lo cual describiré a detalle más adelante.

2. CITOARQUITECTURA DE V1

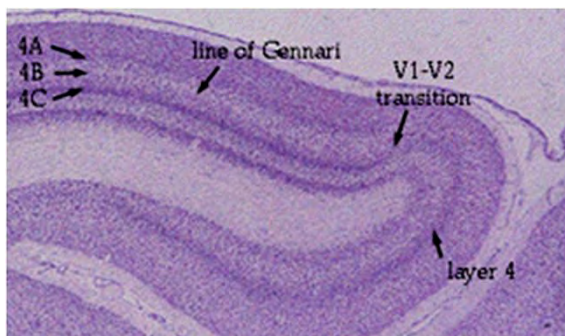


FIGURA 3. Detalle de V1. Sección horizontal teñida con Nissl donde se muestra la frontera entre V1 y V2. Modificada de Hubel (1999).

El área visual primaria presenta una citoarquitectura muy característica; a partir de las investigaciones del neuroanatomista alemán Korbinian Brodmann se le individualizó como área 17 y es coincidente anatómicamente con la correspondiente área visual V1. Esta área supera a cualquier otra parte de la corteza en riqueza anatómica y en complejidad de laminación. Las áreas circundantes a V1, que tienen citoarquitectura diferente, se conocen como corteza extraestriada (ver figura 3 y 4).

Las células en la corteza visual primaria responden a diferentes atributos de los estímulos visuales y esta diferenciación funcional, está íntimamente relacionada a su anatomía. Dentro de V1, la denominada capa 4, que se subdivide en 4A, 4B y 4C que a su vez se subdivide en

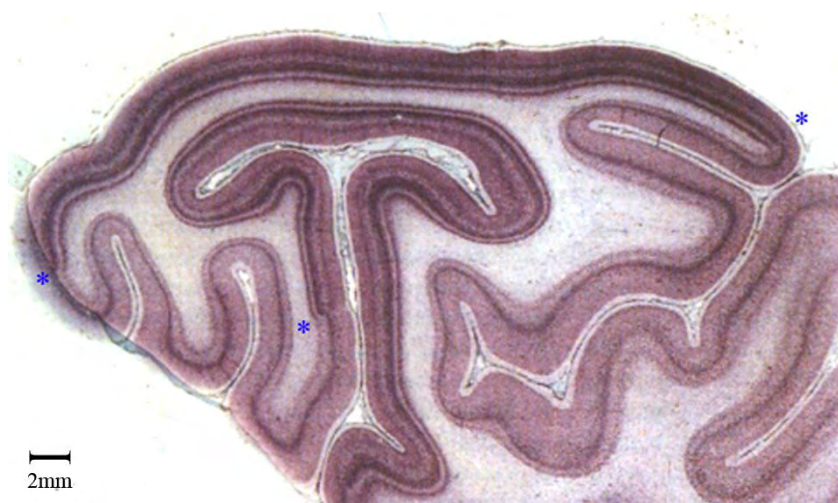


FIGURA 4. Corteza visual de mono. Sección horizontal a través del lóbulo occipital teñida con Nissl. Los asteriscos muestran la frontera entre V1 y V2. Modificada de Hubel (1999).

4C α y 4C β , consta fundamentalmente de células granulares (en forma de estrella), mientras que las capas superior e inferior contienen células piramidales (Hubel y Wiesel, 1972).

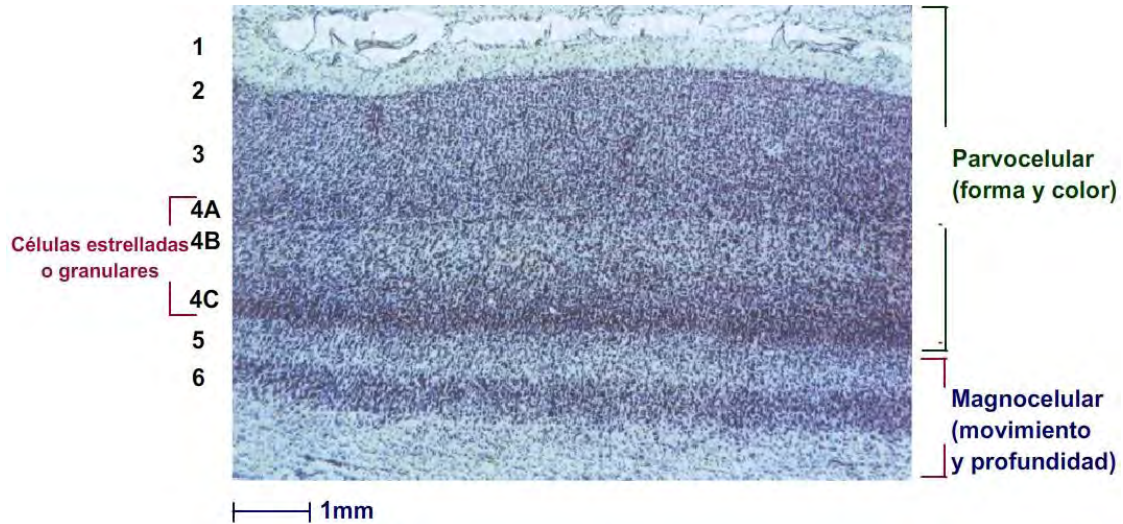


FIGURA 5. Células dispuestas en capas. Las capas 2 y 3 son indistinguibles; la capa 4A es muy delgada. La capa gruesa y pálida de la de la parte inferior es sustancia blanca. Modificada de Hubel (1999).

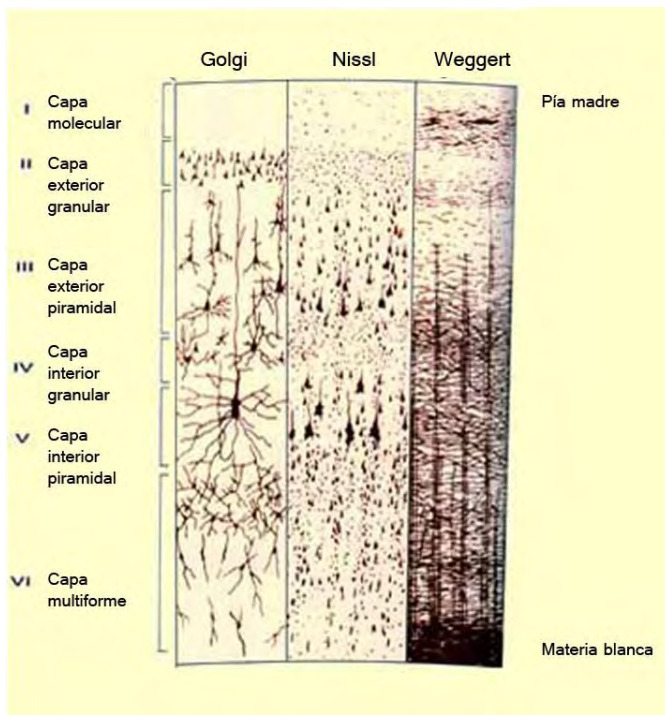


FIGURA 6. Arquitectura de V1. Se muestran los diferentes tipos celulares especializados para mandar y recibir información visual. Modificada de Dubuc (2002).

En el patrón de laminado, es preciso resaltar que la capa 4C es la más densa y oscura, seguida por la 6, la capa 4B se tiñe muy ligeramente al igual que la 1 y 5 que se encuentran menos densamente agrupadas y una hilera de fragmentos que se tiñen de oscuro y que dan lugar a la capa 4A (ver Figura 5). Desde el punto de vista funcional, es importante registrar el conjunto de columnas de tejido que se extienden desde la superficie hasta la sustancia blanca. Las células piramidales aparecen en todas las laminas, excepto en la 1 y 4. Todas las capas excepto la 1, 4A y 4C, envían fibras fuera de la corteza. Las capas 2,3, y 4B proyectan principalmente a otras regiones corticales, mientras que la 5 y 6 proyectan hacia estructuras subcorticales (ver Figura 6).

La dimensión de las áreas visuales es variable. Cada área visual especializada tiene una o más áreas satélites que cooperan en la misma función. Por tanto, V1 actúa como centro de segregación, repartiendo señales distintas, en las diferentes áreas especializadas.

PROYECCIONES SUBCORTICALES

Las células ganglionares de la retina envían axones a diversas zonas del diencefalo y el mesencefalo llamadas *Proyecciones retinianas*. Entre sus destinos están el *núcleo supraquiasmático*, una región del hipotálamo que controla los ritmos circadianos; los *núcleos óptico accesorio y pretectal olivar*, que se encargan del reflejo locomotor pupilar y el *tubérculo cuadrigémino superior*, que contribuye a controlar los movimientos oculares e interviene en los denominados reflejos visuales. El tubérculo cuadrigémino superior, a su vez, proyecta al *pulvinar*, el mayor núcleo del tálamo. El pulvinar recibe fibras del tubérculo cuadrigémino superior, el área pretectal para V1, la cual envía información a las *áreas asociativas visuales*.

La mayoría de las células ganglionares de la retina envían axones al *núcleo geniculado lateral* por medio del nervio y el quiasma ópticos y la cintilla óptica. Esta conexión se llama *proyección retinogeniculada*. Esta vía mantiene un mapa ordenado del espacio visual. Los campos correspondientes de los fotorreceptores siguen una disposición precisa en la superficie retiniana. Las células ganglionares adyacentes perciben puntos adyacentes en el mundo visual. Esta representación ordenada del mundo visual en la retina se llama *mapa retinotópico*.

3.1 El **campo visual** es la parte del mundo vista por el sujeto con los dos ojos abiertos y mirando hacia adelante. Consta de una *zona binocular* –la amplia región central vista por ambos ojos- y las *zonas monoculares* derecha e izquierda (o semilunas monoculares) vistas sólo por el ojo correspondiente. En consecuencia, los defectos del campo visual normalmente se señalan como pérdidas del campo perteneciente a cada ojo. Cada *campo visual* se divide en una mitad nasal y otra temporal, y cada una de estas mitades en otras dos partes, la superior y la inferior (lo que produce *cuadrantes*). Así, cada campo visual está compuesto por cuatro cuadrantes

Un flujo de fotones puede concebirse como un rayo de luz que entra en el ojo. Los rayos de luz dispersos quedan bloqueados por las células pigmentarias de iris; sólo la luz que pasa a través de la pupila alcanza la retina. El rayo de luz es desviado por la córnea y el cristalino, de modo que la imagen quede enfocada en la retina. La luz del mundo visual inferior llega a la retina superior; la del mundo visual derecho choca con la retina temporal del ojo izquierdo y la retina nasal del ojo derecho. Estos patrones son esenciales para entender la visión normal y los defectos en los campos visuales que se ven en pacientes con lesiones de estas vías. El mapa retinotópico se mantiene a lo largo de todo el sistema visual.

3.2 Los axones de las **células ganglionares** de la retina que transportan información desde todas sus áreas convergen en la *papila óptica*, donde perforan la corioides y la esclerótica para formar el *nervio óptico*. En la *capa de fibras nerviosas* de la retina, los axones de las células ganglionares son amielínicos. Sin embargo al pasar por la esclerótica, quedan recubiertos por la mielina formada por los oligodendrocitos. Dado que no hay células fotorreceptoras en la papila óptica, la luz que llega a esta área no se percibe. Por consiguiente, esta parte de la retina es llamada *punto ciego*. La agudeza visual es mayor en la fovea, pero en la retina periférica es menor la visión de las formas: los detalles finos no pueden ser percibidos en la retina periférica debido a que la densidad de los bastones es mucho más baja.

3.3 El **nervio óptico** se extiende desde la parte posterior del ojo hasta el *quiasma óptico*. Este nervio va envuelto en una funda de duramadre y aracnoides que se continúa con la que recubre al cerebro. Por tanto, el espacio subaracnoideo se prolonga a lo largo del nervio óptico, el cual está bañado por líquido cefalorraquídeo. Por este motivo, los aumentos de la presión endocraneal pueden transmitirse a lo largo del nervio óptico y causar un bloqueo del flujo axoplásmico en la cabeza del nervio óptico, provoca una hinchazón de la cabeza del nervio óptico. El daño resultante puede provocar una pérdida parcial o total de la visión en ese ojo.

Las ramas terminales de la arteria central de la retina, rama a su vez de la arteria oftálmica, se originan a nivel de la papila óptica y se irradian por la retina. El examen de estos vasos a través de un *oftalmoscopio* puede ayudar a valorar la salud ocular y del

sistema nervioso central. Los cambios en la configuración de los vasos retinianos o en el tamaño o la forma de la papila óptica pueden indicar afecciones de la retina, el sistema vascular o el sistema nervioso central.

En un nivel rostralateral al tallo hipofisario, los nervios ópticos se unen para formar el *quiasma óptico*, del cual se bifurcan las cintillas ópticas para seguir su trayecto caudal. En el quiasma, las fibras de la mitad *nasal* de cada retina se cruzan para entrar en la cintilla óptica contralateral, mientras que las fibras de la mitad *temporal* siguen por el mismo lado y entran en la cintilla óptica ipsilateral. De esta forma, cada mitad del cerebro recibe las fibras pertenecientes a la mitad contralateral del mundo visual.

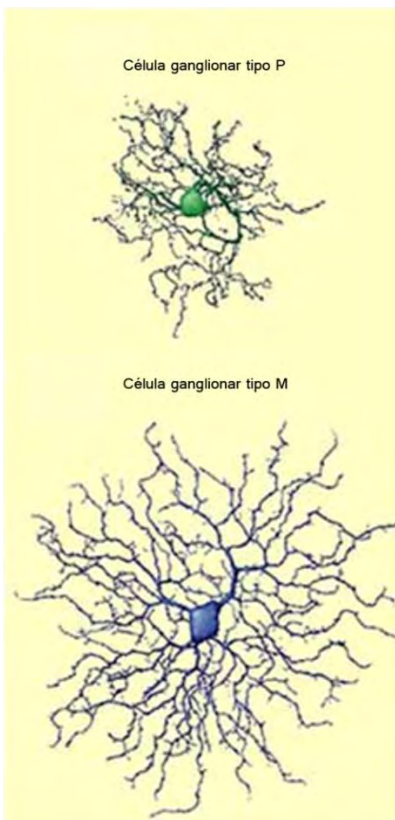


FIGURA 7. Células Ganglionares.
Caricatura modificada de Dubuc (2002)

Si bien muchas situaciones clínicas pueden afectar al quiasma óptico, esta estructura es especialmente sensible a los tumores de la hipófisis, que pueden llegar a dañar las fibras que se cruzan en la línea media del quiasma, interrumpiendo la información visual de las mitades temporales de ambos campos visuales, lo que ocasiona una *hemianopsia bitemporal*. Una lesión que dañe la parte lateral del quiasma puede interrumpir sólo las fibras nerviosas que transportan información desde el campo visual nasal del mismo lado, aunque en la práctica esta situación es bastante rara. Este déficit se llama *hemianopsia nasal ipsilateral*.

3.4 El **núcleo geniculado lateral** está situado en el interior de una elevación en la zona caudoventral del diencefalo, el *cuerpo geniculado lateral*. En el ser humano consta de seis capas celulares con finas láminas de fibras mielínicas emparedadas entre ellas. La base anterior de este núcleo está formada por las fibras de llegada de la *cintilla óptica*, mientras que sus bordes posterior y lateral están constituidos por las *radiaciones ópticas* de salida. Las capas celulares se numeran del 1 al 6, desde la más anterior a la más posterior. Como se explica en las dos secciones siguientes, estas capas pueden agruparse tanto por el tipo de

información que reciben desde las células ganglionares como por el lado de la retina del cual procedan.

3.5 Capas magnocelular y parvocelular. Las capas 1 y 2 del geniculado lateral están formadas por células con somas grandes y se llaman capas *magnocelulares*. Las capas 3 a 6 contienen células pequeñas y por ello se les denomina capas *parvocelulares* (ver figura 7). La subdivisión del geniculado lateral en las capas magnocelulares y parvocelulares se correlaciona con la subdivisión de las células ganglionares de la retina de las clases X y Y. Las fibras Y (M) terminan en las capas magnocelulares, mientras que las fibras X (P) lo hacen en las capas parvocelulares. Las células ganglionares Y obtienen su información principalmente de los bastones y tienen campos receptores más grandes y axones gruesos y de conducción veloz. Las células ganglionares X reciben información sobre todo de los conos y tienen campos receptores pequeños y axones de velocidad más lenta; éstos nacen fundamentalmente en la retina central y son responsables de la gran agudeza en la visión de los colores. Las células ganglionares de la clase mixta W restante terminan en células pequeñas esparcidas entre las capas principales.

Los axones de las células ganglionares que nacen en la retina *temporal* siguen su trayecto en el mismo lado al pasar a través del quiasma óptico y terminan en las capas 2, 3 y 5 del núcleo geniculado lateral *ipsolateral*. Por el contrario, los axones procedentes de la retina nasal cruzan por el quiasma y terminan en las capas 1, 4 y 6 del geniculado lateral *contralateral*.

Las células de relevo que forman las capas del núcleo geniculado lateral reciben información de las células ganglionares (como *fibras retinogeniculadas*) y envían sus axones a la corteza visual primaria ipsilateral como un gran haz de fibras mielínicas, las **radiaciones ópticas**. En consecuencia, las radiaciones ópticas también se llaman *vía genicuoestriada o geniculocalcarina* (ver figura 8).

3.6 Las radiaciones ópticas se pueden dividir en dos haces principales, uno para el cuadrante inferior de los hemisferios contralaterales y otro para el superior. Las fibras correspondientes al cuadrante inferior de los hemisferios contralaterales se originan en la porción dorsomedial del núcleo geniculado lateral, se incurvan directamente en sentido

caudal para pasar a través del brazo retrolenticular de la cápsula interna, y hacen sinapsis en la corteza del labio superior del surco calcarino, en la cuña. Por consiguiente, una lesión en la parte superior de las radiaciones ópticas provoca una *cuadrantanopsia inferior contralateral*.

Las fibras correspondientes al cuadrante superior de los hemicampos contralaterales se originan en la parte ventrolateral del núcleo geniculado lateral. Estas fibras no viajan directamente en sentido caudal hacia la corteza visual, sino que giran hacia arriba, entran en

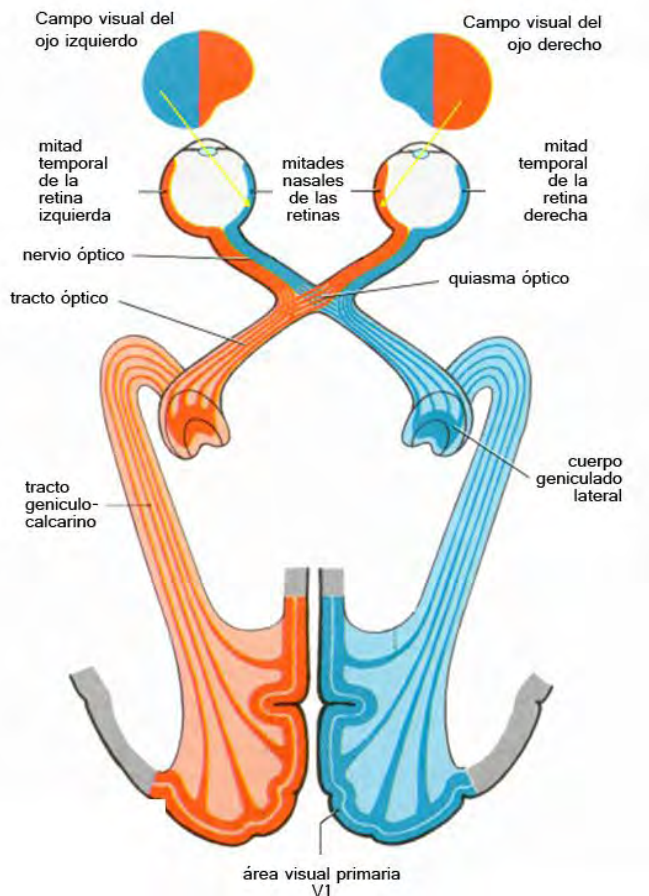


FIGURA 8. La vía visual. Se muestra el flujo de información desde la retina hasta V1. Modificado de Kahle y Frotscher (2003).

la sustancia blanca del lóbulo temporal y forman un amplio bucle en U antes de seguir en sentido caudal para hacer sinápsis en el labio inferior del surco calcarino, en la circunvolución lingual. La lesión del asa de Meyer en el lóbulo temporal, o de las fibras en su camino hacia el surco calcarino, provoca una *cuadrantanopsia superior contralateral*. Las fibras geniculoestriadas que transportan información desde la mácula se originan en las regiones centrales del núcleo geniculado lateral y se dirigen a las zonas caudales de la corteza visual (ver figura 8).

En las cintillas y las radiaciones ópticas se conciben

fundamentalmente en términos de congruencia e incongruencia. Se dice que un déficit es *congruente* cuando la pérdida del campo visual en un ojo se puede superponer a la del otro ojo. Cuanto más anterior es una lesión en la cintilla o en las radiaciones ópticas, es más

probable que sea incongruente. A la inversa, cuanto más cercana está a las radiaciones y la corteza visuales, es más fácil que sea congruente.

La irrigación sanguínea de las radiaciones ópticas se realiza por medio de las ramas de las *arterias cerebrales medias y posterior*, que penetran profundamente en la sustancia blanca. En general, las fibras de las radiaciones ópticas más laterales y las del asa de Meyer reciben ramas de la arteria cerebral media. Las fibras más mediales y la corteza visual están irrigadas por la arteria cerebral posterior.

3. ORGANIZACIÓN FUNCIONAL

Las áreas extraestriadas de la corteza cerebral se han estudiado menos. Una diferencia muy manifiesta entre V1 y las áreas extraestriadas la constituyen las preferencias de las células respecto al ojo. La mayoría de las células de las áreas extraestriadas son activadas binocularmente, lo que puede tener consecuencias para comprender la percepción de la profundidad y sus bases neurológicas o interpretar cómo desaparece la sensación de dos imágenes diferentes y dar lugar a una visión única o ciclópea (sin diplopía).

El mapa más detallado de la retina y por ende de la fovea también llamada centro de la mirada, se encuentra en el área V1. Hubel (1963; 1979) sugiere que V1 está constituida por un conjunto de columnas de orientación y por otro de columnas de dominancia ocular. Las células que se encuentran en la corteza visual directamente encima o debajo tienden a responder a los estímulos luminosos situados en el mismo punto del espacio visual. Por tanto, se conserva el *orden retinotópico* que se ve en todos los niveles del sistema visual. Sin embargo, hay un grado de complejidad añadido: las células simples que responden mejor a la información del ojo derecho o izquierdo forman bandas estrechas

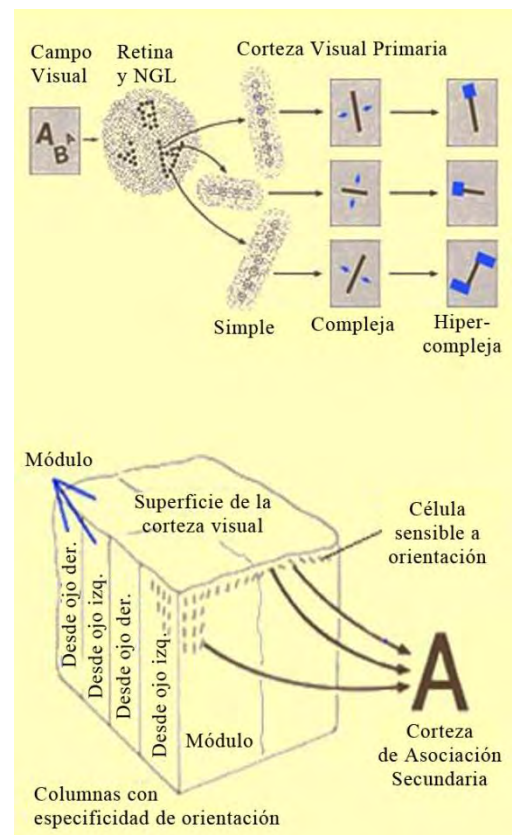


FIGURA 9. Caricatura de una macrocolumna. Se pueden observar las columnas de dominancia ocular y de orientación preferencial. En la parte superior se observa la respuesta celular de acuerdo a su campo receptivo (simples, complejas e hipercomplejas).

paralelas llamadas *columnas de dominancia ocular* (ver figura 9). Si se utiliza un método especial para marcar las células que responden mejor a las señales del mismo ojo, el resultado es un patrón característico de rayas de cebra que puede verse desde la superficie externa de la corteza.

Las bandas llamadas *columnas de orientación* cruzan la corteza perpendiculares a las columnas de dominancia ocular. Estas columnas de orientación contienen células que responden mejor a las barras o los bordes de luz con una orientación particular.

Cada parte del campo visual se proyecta primero para un ojo y después para el otro, y simultáneamente para distintas orientaciones. Si se lesiona cierta parte de V1, se desarrolla una ceguera local, como si se hubiera destruido la parte correspondiente en la retina.

Diversos estudios han confirmado que el área V1 posee una arquitectura altamente modular, y que esta modularidad, o por lo menos la correspondiente al sistema de dominancia de un ojo, puede demostrarse anatómicamente: si se inyecta en el ojo de un mono, un aminoácido marcado, las células de la retina absorben el marcador y éste es incorporado a las proteínas, desplazándose hasta la corteza visual (ver figura 10). El

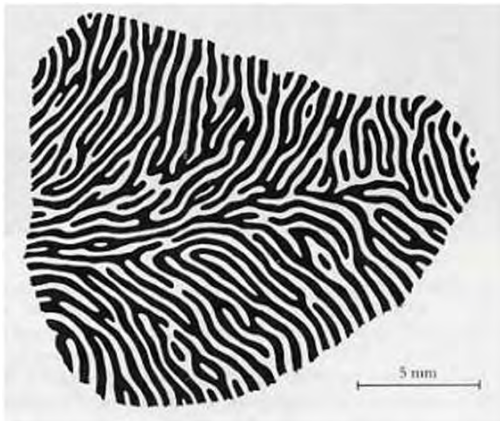


FIGURA 10. Reconstrucción de LeVay. Se muestran las columnas de dominancia ocular en V1. La representación foveal se encuentra a la derecha. Modificada de Hubel (1999).

marcador se sitúa en pequeños espacios de la capa 4, separados por espacios no marcados y que corresponden al ojo no inyectado (Livingstone y Hubel, 1982).

Cuando se proyecta una línea luminosa de orientación idónea en una región determinada del campo receptor celular, esta da una respuesta positiva que se denomina ON. La proyección en regiones colindantes inhibe a la célula y solamente da respuesta cuando desaparece el estímulo, respuesta OFF (Schiller et al., 1986).

El arreglo cortical o unidad mínima funcional que comprende tanto a las columnas de dominancia ocular como a las columnas de orientación, se les denomina *Macrocolumnas* (ver figura 9).

Según su estructura se dividieron en células simples y complejas. Las células complejas son selectivas en relación con la orientación, al igual que las simples, pero se diferencian en que estas últimas tienen campos receptores mayores y en lugar de presentar zonas concretas desde las que se puede obtener respuestas ON y OFF, ambos tipos de respuestas se pueden obtener estimulando cualquier parte del campo receptor. En la corteza de asociación visual se observaron células aún más complejas a las que se conoce con la denominación de hipercomplejas (Wiesel y Hubel, 1974; Hubel et al., 1977).

En la corteza visual se transforma la organización centro-periferia del campo receptor hallada en niveles previos. Las células simples de la capa IV de V1 responden mejor a las barras o los bordes de luz que a los puntos o los anillos. En general, a medida que se avanza hacia la superficie de la piamadre o hacia la sustancia blanca, las propiedades del campo receptor se vuelven aún más complejas. Estas células responden potentemente a las barras con una orientación particular. A diferencia de las células simples, la ubicación dentro del campo receptor no es importante en las células complejas.

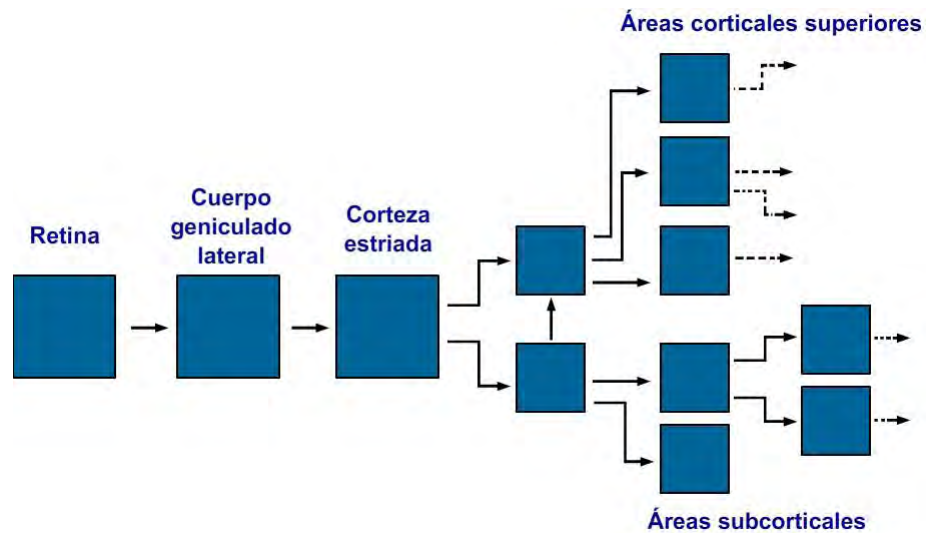
Recapitulando, la información visual desde la retina hasta la corteza estriada, está organizada de forma jerárquica, es decir, en un esquema en el que cada centro nutre sucesivamente al siguiente, sin descartar la existencia de módulos en el mismo nivel (ver figura 11). Hubel y Wiesel (1979) estudiaron las propiedades fisiológicas de las células de V1 por medio de electrodos introducidos en su proximidad y conectados a un osciloscopio y a un monitor de audio. La respuesta de la célula al estímulo es conocida como su campo receptor como ya se mencionó antes; por tanto un campo receptivo es la parte del campo visual en que la presentación del estímulo visual producirá una respuesta en la tasa de disparos de una neurona específica.

Utilizando luces de orientación diferente descubrieron que todas las células de V1 tenían campos receptores muy pequeños y que todas las células externas a la capa que recibe el impulso predominante desde el núcleo geniculado lateral, es decir, la capa 4, eran

selectivas respecto a la orientación. El estímulo activador eficaz era una línea luminosa que tuviera la orientación correcta y que incidiera en la parte adecuada del campo receptor celular.

En el mono, las células de la capa 4C β reciben aferencias de las 4 capas superiores (parvocelulares) del geniculado, tienen propiedades de centro-periferia, sin selectividad para la orientación. En la capa 4C α , cuyas aferencias proceden del par de capas ventrales (magnocelulares) del geniculado, algunas células tienen campos con centro-periferia, otras tienen especificidad de orientación, con campos receptores simples. La mayoría de las células 4C son complejas.

FIGURA 11. Flujo de información. Cada estructura ilustrada en forma de cuadro se compone de millones de células agrupadas en láminas. Cada una recibe información de entrada de una o más estructuras de los niveles inferiores de la vía y cada una envía información de salida a varias estructuras de los niveles superiores. Modificada de Hubel (1999).



4. PROYECCIONES CORTICALES

Las áreas corticales están organizadas en un sentido jerárquico muy bien definido según Felleman y Van Essen (1991), donde cada área ocupa una posición específica en relación a las demás, pero con espacio para más de una área por nivel. Una característica muy importante es que ésta jerarquía exista en un sentido flexible; por ejemplo a nivel de lóbulos cerebrales, pero no en sentido definido para áreas corticales. Por lo tanto, debe notarse que *el flujo de información en un sistema jerárquico puede:*

- a) viajar en dos direcciones
- b) saltarse niveles intermedios para llegar desde un nivel inferior a uno superior
- c) viajar en paralelo a través de varios canales con funciones distintas.

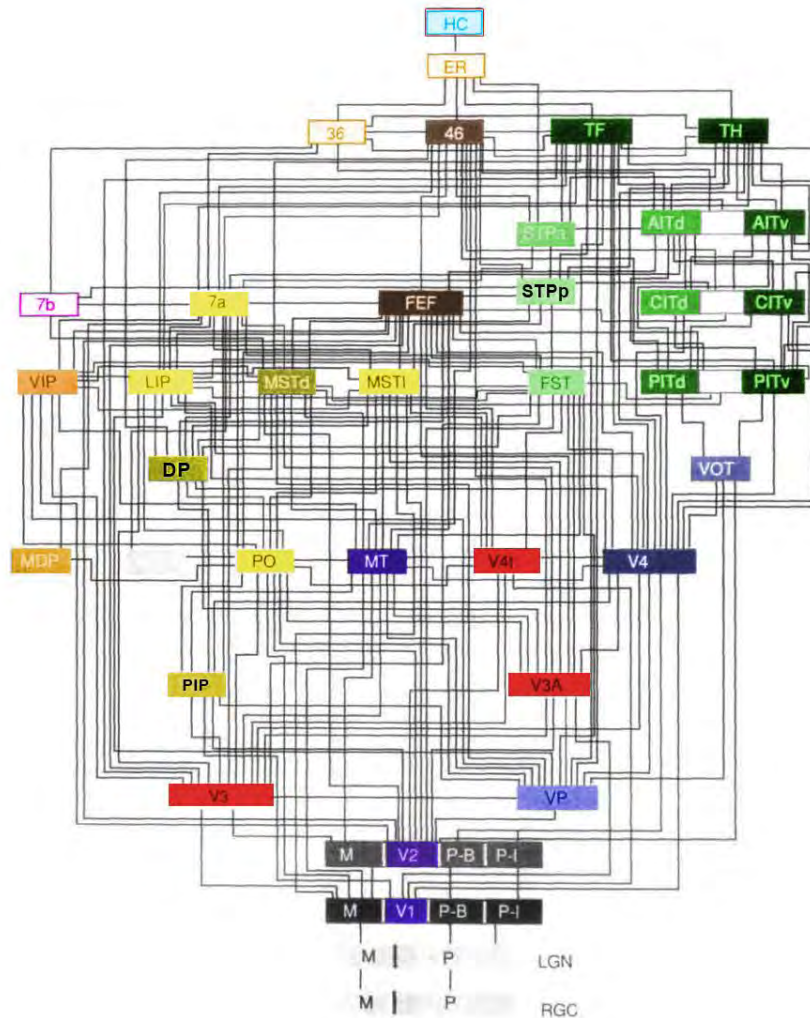


FIGURA 12. Jerarquía de las áreas visuales. Se muestran 32 áreas visuales corticales, dos áreas subcorticales (capa de células ganglionares retinales y LGN) más varias áreas no visuales. Estas áreas están interconectadas por 187 líneas, la mayoría de las cuales ha demostrado un funcionamiento como rutas recíprocas. Coloreada de acuerdo a ubicación anatómica ejemplo, verde: áreas temporales, amarillo: áreas parietales. Modificado de Felleman y Van Essen (1991).

Esta jerarquía se basa en la anatomía de las áreas visuales corticales según Maunsell y Van Essen (1983). La jerarquía cortical muestra 7 niveles jerárquicos basados en 92 rutas sobre 17 áreas corticales Van Essen et al. (1992). Para identificar relaciones jerárquicas se incluye todos los tipos de patrones laminares identificados a la fecha. Los patrones distintos están arreglados para mostrar las distribuciones

laminares de células de origen y terminaciones axonales que fueron consideradas para ser indicadores de rutas ascendentes, laterales y descendientes (ver figura 12).

Las ideas actuales sobre la organización jerárquica en el sistema visual de primates nacieron por nociones de rutas de “feedforward y feedbackward” (que literalmente significa retroalimentación de dos vías, ida y vuelta) sugeridas por patrones de conectividad; en particular Rockland y Pandya en 1979 fueron los que mostraron que las proyecciones en una dirección tienden a originarse en capas superficiales y terminar en la capa 4, mientras que en dirección opuesta, surgen desde las capas superficiales y terminan fuera de la capa

4. Esto se usó como una base para proponer una jerarquía explícita y basada en anatomía de las áreas visuales corticales. La versión original de la jerarquía cortical mostraba 6 niveles y estaba basada en 36 rutas sobre 13 áreas corticales. Fue extendida a 7 niveles jerárquicos basados en 92 rutas sobre 17 áreas corticales (ver figura 12). Para identificar relaciones jerárquicas se incluye todos los tipos de patrones laminares identificados a la fecha. Los patrones distintos están arreglados para mostrar las distribuciones laminares de células de origen y terminaciones axonales que fueron consideradas para ser indicadores de rutas ascendientes, laterales y descendientes (Van Essen et al., 1990).

Hubel y Wiesel descubrieron que las células que eran selectivas a la longitud de onda lo eran también respecto a la orientación, lo que sugería en el sentido de un mecanismo aditivo en armonía con la estrategia jerárquica.

Una parte de este análisis se enfoca en la naturaleza de cadenas de procesamiento concurrentes en la corteza visual. Estas cadenas están ligadas del lado “input” a las capas M (magnocelular) y P (parvocelular) del LGN (nucleo geniculado lateral); y del lado “output” a regiones funcionalmente distintas de los lóbulos parietal y temporal.

Investigaciones previas han concluido que la representación del campo inferior ocupa más área en la corteza que la que ocupa la representación del campo superior (Van Essen et al., 1984; Tootell et al., 1998). En los humanos, la agudeza visual, contraste, sensibilidad, resolución temporal y tiempo de reacción son ligeramente mejores en el campo visual inferior (Millodot y Lamont 1974, Skrandies, 1985).

La extensión general de la corteza visual corresponde a las regiones identificadas en el estudio por 2-desoxiglucosa de Mishkin y Ungerleider (1982) aunque no todas estas áreas son exclusivamente visuales en función. Las contribuciones no visuales incluyen inputs de otras modalidades sensoriales (auditivas y somatosensoriales), actividad visuomotora e influencias atencionales o influencias cognitivas. Se han trazado 25 áreas que aparentan ser predominantemente o exclusivamente visuales y otras 7 áreas neocorticales que están menos ligadas a la visión y que serán consideradas áreas de asociación visual.

5. VIAS DE PROCESAMIENTO DE INFORMACIÓN

De acuerdo a la evidencia fisiológica, existen dos circuitos funcionales principales: Uno participa en el análisis de movimiento visual (seguimiento de la trayectoria y velocidad de movimiento de los objetos en el espacio), mientras que el otro se relaciona con el análisis de la forma y el color (Van Essen, 1990; Felleman y Van Essen, 1991; Beizer et al., 1991; DeYoe et al., 1994; Felleman et al., 1997) como se esquematiza en la figura 13.

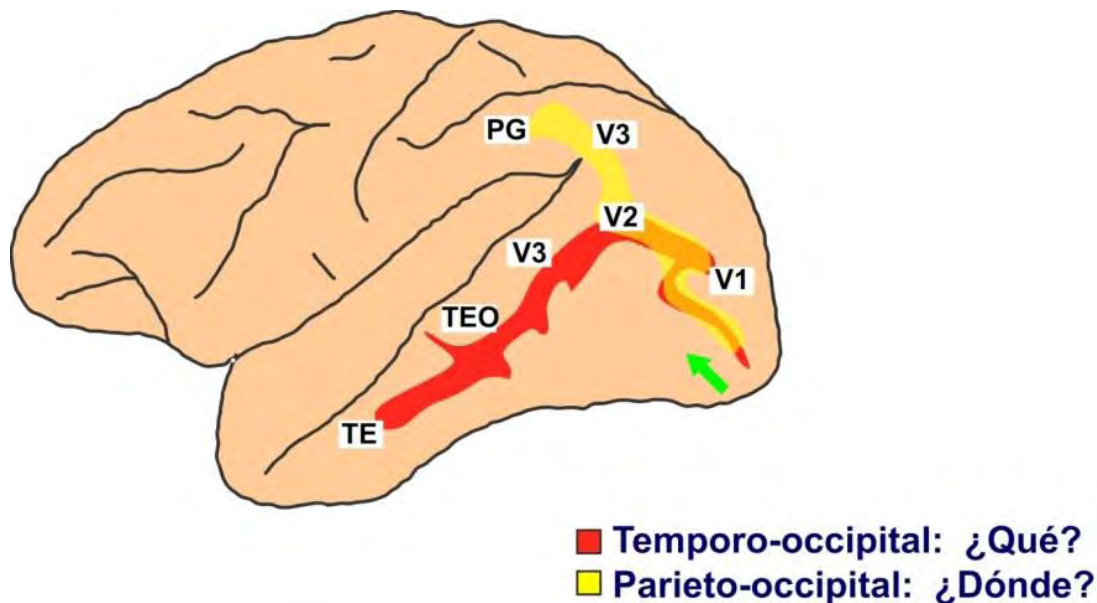


FIGURA 13. Las dos vías. Se muestran los nodos corticales asociados a los circuitos ventral (rojo) y dorsal (amarillo). Modificado de Ungerleider y Miskin (1983).

Vía Parieto-occipital o sistema M (magnocelular). Comprende la capa 4B de V1, el output desde la capa 4B hasta el área V5 —a través de V2— y el output adicional desde V5 hasta la corteza parietal. Esta vía está relacionada con la percepción espacial y la localización de los objetos, respondiendo la pregunta “¿Dónde?” están los estímulos visuales. Las lesiones en alguna parte de esta vía provoca la pérdida de información sobre la ubicación de los objetos en el espacio. Experimentalmente se ha encontrado una incapacidad para realizar satisfactoriamente ejercicios de relación espacial.

Vía Temporo-occipital, o sistema P (parvocelular). Se localiza en las capas 2 y 3 de V1, el output que va desde estas dos capas hasta V4 —directamente o a través de V2—,

y el que va de V4 a la corteza temporal inferior, el área de máximo orden para la percepción visual de objetos, es decir “¿Qué?” se está viendo. Las lesiones en algún componente de esta vía, resultan en alteraciones en la percepción de la forma, color, tamaño y/o textura.

Los primeros estudios de estas vías indicaron que la vía P se prolonga en la vía cortical ventral que se extiende hasta la corteza temporal inferior y la vía M se convierte en la vía dorsal, que se dirige hacia la corteza parietal posterior. Sin embargo, es probable que las relaciones reales no sean tan exclusivas.

Las pruebas sobre la separación funcional de las vías dorsal y ventral comienzan a ser evidentes en la corteza visual primaria o estriada (V1). La tinción de la enzima mitocondrial citocromo oxidasa (CO) revela un patrón preciso y repetitivo de regiones oscuras en forma de tachuela, de unos 0.2mm de diámetro. La reactividad enzimática de CO en la mitocondria refleja actividad neuronal crónica y su patrón en las capas supragranulares es en forma de parches, revelando las llamadas — manchas”.

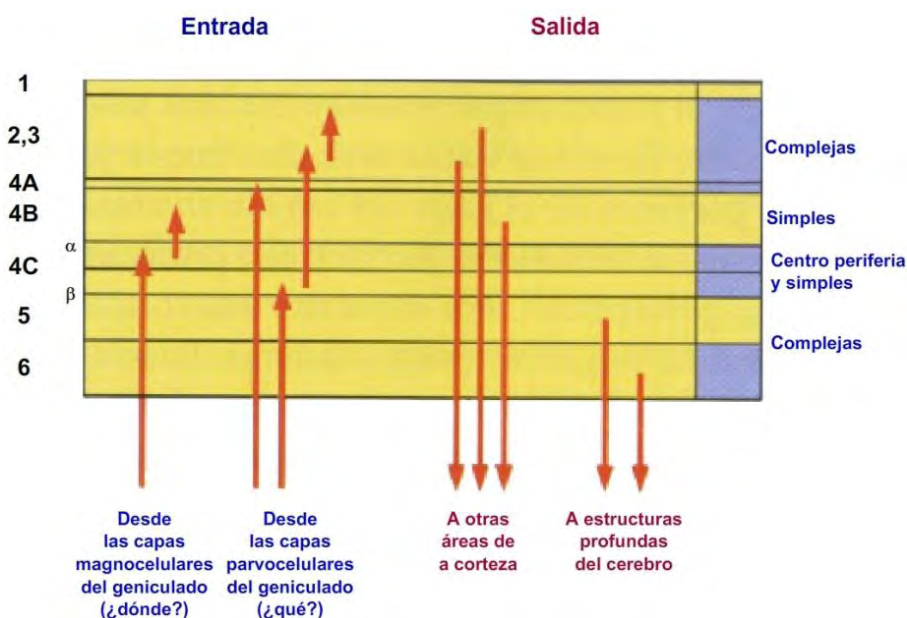
Estas manchas son especialmente visibles en las capas superficiales 2 y 3, donde están separadas por regiones interpuestas de tinción débil, las regiones intermanchas. Esta misma tinción revela bandas gruesas y finas alternantes separadas por zonas intermedias de escasa actividad.

Margaret Livingstone y David Hubel identificaron las conexiones anatómicas existentes entre las regiones marcadas de V1 y V2. Observaron que las vías P y M permanecen parcialmente separadas a través de V2. La vía M se proyecta desde las capas magnocelulares del núcleo geniculado lateral a la corteza estriada, primero a la capa 4C α y β , después a la 4B. Las células de la capa 4B se proyectan directamente en el área temporal media o V5 y también en las bandas gruesas de V2, cuyas células también se proyecta hacia V5 y desde ésta a la corteza parietal posterior (Merigan y Maunsell, 1993). Ver figura 14.

Las células de las capas parvocelulares del núcleo geniculado lateral se proyectan en la capa 4C de V1 cuyas células establecen conexiones con las células ubicadas en las manchas y las regiones intermanchas de V1. La separación entre aferencias y eferencias en el área

V2 es tan marcada como en V1, también representa un patrón específico de tinción de CO que en este caso es un patrón alternante de bandas oscuras con franjas claras, cuya disposición es perpendicular al límite entre V1 y V2. Las bandas que son mayores que las manchas de CO observadas en V1, ocupan toda la anchura del área, lo que contribuye a la demarcación histológica de sus límites (ver figura 3). El grosor de las bandas de tinción más oscuras es variable y esta alternancia de bandas delimita tres compartimentos en V2. Las bandas finas reciben aferencias de las manchas de CO de la capa 3B de V1 mientras que las franjas de tinción débil las reciben de las áreas localizadas entre las manchas de CO de la capa 3B. Las bandas anchas reciben sus aferencias de células de la capa 3C de V1 situadas por encima de la capa de aferencias de las aferencias magnocelulares del NGL. Por tanto, estas bandas reciben la información directa de V1 (ver figura 14).

Las células de las manchas de V1 envían una fuerte proyección a las bandas finas de V2, mientras que las intermanchas lo hacen a las interbandas de la misma zona cortical. A su vez, las áreas de bandas e interbandas finas de V2 pueden proyectarse a subregiones separadas de V3, manteniendo así la separación de la vía P en V4 y, posiblemente, en la corteza temporal inferior. Así, puede identificarse una vía que va desde las células P del núcleo geniculado lateral a la corteza temporal inferior (Merigan y Maunsell, 1993).



En V1, tanto la vía magnocelular como la parvocelular reciben aferencias de las manchas y las neuronas locales establecen amplias conexiones entre los compartimentos de manchas e intermanchas. En

FIGURA 14. Principales conexiones. Son efectuadas por axones desde el cuerpo geniculado lateral a V1 y desde V1 a otras regiones cerebrales. A la derecha, el sombreado azul muestra la relativa densidad de la tinción Nissl. Modificado de Hubel (1999).

V2 existen conexiones cruzadas entre los compartimientos de las bandas. Por tanto, la separación no es absoluta, pero se ignora si se producen entrecruzamientos en las contribuciones M y P o si existen conexiones cruzadas que permiten a una vía cortical regular la actividad de la otra.

Los resultados de los experimentos de inactivación selectiva de las vías P o M cuando pasan por el núcleo geniculado lateral también apoyan la ausencia de una segregación absoluta entre las vías en V1. En V1, el bloqueo de cualquiera de las dos vías afecta a las respuestas de menos de la mitad de las neuronas, lo que indica que gran parte de las neuronas de esta área reciben impulsos aferentes fisiológicamente efectivos de las dos vías. También se ha demostrado que las respuestas de las neuronas tanto de dentro como de fuera de las manchas de las capas superficiales de V1 se alteran cuando se bloquea sólo la vía M. Ambos tipos de observaciones indican que la segregación de las vías P y M en V1 es incompleta (Merigan y Maunsell, 1993).

El bloqueo selectivo de las vías M y P muestra también las contribuciones relativas de ambas a las vías que se dirigen a la corteza parietal y temporal inferior. El bloqueo de las capas magnocelulares en el núcleo geniculado lateral elimina las respuestas de muchas de las células de V5 y siempre reduce las respuestas de las demás células; el bloqueo de las capas parvocelulares produce un efecto mucho más débil en las células V5. Por el contrario, el bloqueo de la actividad de las capas tanto parvocelulares como magnocelulares en el núcleo geniculado lateral reduce la actividad de las neuronas de V4 (Merigan y Maunsell, 1993). Así pues, parece que la vía dorsal hacia V5 recibe fundamentalmente los impulsos aferentes transportados por la vía M, mientras que en la vía ventral hacia la corteza temporal inferior viajan aferencias procedentes de ambas vías, P y M. De todo ello podemos deducir que existe una separación sustancial entre las vías P y M hasta V1, una probable separación en V2, un posible predominio de los impulsos aferentes M en la vía dorsal hacia V5 y la corteza parietal, y una mezcla de impulsos aferentes P y M en la vía que conduce al lóbulo temporal inferior.

Existen vías seriadas específicas a través de las múltiples áreas visuales y no sólo una distribución aleatoria de áreas de conexiones iguales. Existen diversos datos que

confirman la existencia de dos vías principales de procesamiento, una dorsal a la corteza parietal posterior y una ventral a la corteza temporal inferior, pero también podría haber otras. En segundo lugar, hay pruebas concluyentes de que en estas dos vías corticales el procesamiento es jerárquico. Cada nivel envía fuertes proyecciones al nivel siguiente y el tipo de procesamiento visual cambia de forma sistemática de un nivel a otro. En tercer lugar, a juzgar tanto por sus conexiones anatómicas y la actividad celular, las funciones de las áreas corticales de las dos vías son notablemente distintas (Felleman y Van Essen, 1991).

Experimentos realizados con monos han demostrado que las neuronas de la retina y del núcleo geniculado lateral, así como de muchas áreas de la corteza estriada y extraestriada, responden muy bien a una mancha de luz que se mueve a través de sus campos receptivos. Sin embargo en el área V1, las células responden al movimiento en *una* dirección mientras que el efecto del movimiento en dirección opuesta es escaso o nulo. Esta selectividad direccional es importante en las células de la capa 4B de la corteza estriada. Así pues, las células de la vía M proporcionan aferencias a las células de la capa 4B pero estas no tienen por sí mismas selectividad direccional. Simplemente proporcionan aferencias brutas para las células corticales que sí poseen selectividad direccional.

6. LAS CÉLULAS DE V5 RESPONDEN AL MOVIMIENTO

En los monos, parece haber una zona en el borde de la corteza parietal, el área temporal media o V5, dedicada al procesamiento del movimiento, ya que casi todas sus células tienen selectividad direccional y la forma o el color del estímulo móvil sólo modifican sustancialmente la actividad de una pequeña fracción de ellas. Como en V1, en el área V5 existe un mapa retinotópico del campo visual contralateral pero los campos receptivos de las células en el interior de este mapa son unas diez veces mayores que los de las células de la corteza estriada. Las células con especificidad direccional similar se organizan en columnas verticales que van desde la superficie de la corteza a las sustancia blanca. Cada parte del campo visual está representada por un conjunto de columnas en las que las células responden a movimientos de direcciones diferentes en esa parte del campo visual. Esta organización columnar es similar a la de V1.

Las células del área V5 responden al movimiento de manchas o barras de luz detectando los contrastes de iluminación. Algunas de estas células responden también a formas en movimiento que no se definen por diferencias de luminancia sino tan sólo por diferencias de textura o color. Aunque estas células no son selectivas para el color propiamente dicho, pueden no obstante, detectar el movimiento correspondiente a un borde definido por el color. Por tanto, aunque el área V5 y la vía dorsal de la corteza parietal estén dedicadas al análisis del movimiento, las células son sensibles a estímulos que se creía eran analizados fundamentalmente por las células de la vía ventral. En consecuencia, el procesamiento de la información de movimiento, forma y color procedente del estímulo no tiene lugar exclusivamente en vías funcionales distintas.

Una zona cortical adyacente al área V5, el área temporal superior medial (TSM) también posee neuronas que responden al movimiento visual y que pueden procesar un tipo de movimiento global en el campo visual llamado flujo óptico, importante para los movimientos propios de la persona en relación con su entorno.

Al provocar lesiones químicas focales separadas en distintas regiones del mapa retinotópico del área V5 de un mono, el animal no pudo seguir calculando correctamente la velocidad del objeto móvil en la región del campo visual. Por el contrario, estas lesiones no alteraron el seguimiento de los objetos en otras regiones del campo visual ni afectaron a los movimientos oculares dirigidos a objetos estacionarios. Así pues, el procesamiento visual en el área V5 es selectivo para el movimiento del estímulo visual; las lesiones producen una mancha ciega, o escotoma, para el movimiento.

En ocasiones, los pacientes con lesiones de la corteza parietal sufren este déficit de los movimientos oculares de seguimiento continuo aunque el déficit de conducta más frecuente es muy distinto del observado tras la provocación de lesiones en el área V5. El neurólogo Gordon Holmes describió que esto pacientes eran incapaces de seguir un objeto cuando se movía hacia el lado del encéfalo en el que se encontraba la lesión. Por ejemplo, un paciente con una lesión en el hemisferio derecho tenía dificultad para seguir un objeto que se desplazaba hacia la derecha. Experimentos posteriores realizados en monos demostraron que las lesiones centradas en el área temporal superior medial (TSM), es decir,

en el nivel siguiente del procesamiento del movimiento visual, producen este tipo de déficit (Dürsteler et al., 1987).

La lesión del área V5 reduce la capacidad de los monos para detectar el movimiento en el campo visual, como reflejan las interrupciones del seguimiento de los objetos móviles y la percepción de la dirección del movimiento. Sin embargo, los monos con lesiones en el área V5 recuperan rápidamente estas funciones. Aparentemente, las células selectivas para la dirección de otras áreas de la corteza cerebral, por ejemplo del área TSM, pueden asumir las funciones que antes llevaban a cabo las del área V5. La recuperación funcional se retrasa mucho cuando la lesión afecta no sólo al área V5 sino también al TSM y a otras áreas extraestriadas (Baker et al., 1991).

Si las células del área V5 intervienen directamente en el análisis del movimiento, sus patrones de activación deberían afectar a los juicios de la percepción sobre el movimiento. Movshon et al. (1985) registraron la actividad de las neuronas selectivas para la dirección en el área V5 al mismo tiempo que los monos comunicaban la dirección del movimiento en una pantalla con manchas de movimientos aleatorios. Se observó que la correlación entre la activación neuronal y el rendimiento era extraordinariamente buena. Así pues, la información sobre la dirección codificada por las neuronas del área V5 es suficiente para justificar el juicio que hace el mono sobre el movimiento.

Si esta conclusión es correcta, la modificación del ritmo de activación de las neuronas del área V5 debería alterar la percepción del movimiento que tiene el mono. De hecho, Newsome y Pare (1988) observaron que cuando se estimulan grupos de neuronas de una sola columna de células sensibles a una dirección del movimiento, se produce un sesgo en la apreciación que el animal hace de la dirección del movimiento. La estimulación eléctrica actúa como añadiera una señal de movimiento visual constante a la señal transportada por la totalidad de la población de las neuronas del área V5 (Salzman y Newsome, 1994). Por tanto, la actividad de una población relativamente pequeña de neuronas sensibles al movimiento en el área V5 contribuye directamente a la percepción.

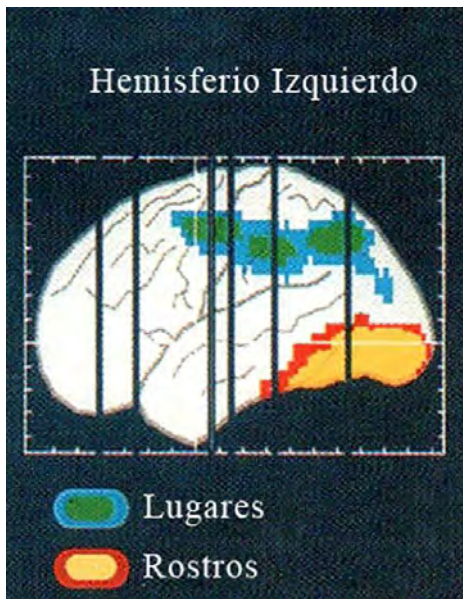


FIGURA 15. Flujo sanguíneo detectado con PET. Se muestra las áreas corticales activadas específicamente para caras en rojo-amarillo y espacio en azul-verde. Se puede observar la segregación del procesamiento de objeto y espacio de las vías ventral y dorsal en áreas extraestriadas. Modificado de Courtney et al. (1996).

7. LAS CÉLULAS DE V4 RESPONDEN A LA FORMA

Los primeros estudios de las células de V4 indicaron que eran selectivas para el color y se creyó que estaban dedicadas en exclusiva a la visión de los colores. Sin embargo, muchas de estas mismas células también son sensibles a la orientación de barras de luz y responden mejor a estímulos formados por granos finos que por granos gruesos. Así pues, algunas células de V3 responden a combinaciones de color y forma.

Los experimentos han demostrado que la ablación de V4 afecta a la capacidad del mono para discriminar entre patrones y formas, pero que altera en muy escasa medida su capacidad para distinguir colores con tonos y grados de saturación diferentes. En otros experimentos, la ablación de V3 sólo deterioró las discriminaciones sutiles de los colores, como la capacidad para identificarlos en distintas condiciones de iluminación.

Algunas personas pierden la visión de los colores cuando sufren lesiones localizadas en la corteza occipital ventral. Los estudios con PET de personas normales revelan un aumento de la actividad de las circunvoluciones de la língula y la fusiforme en presencia de estímulos coloreados (Zeki et al., 1991). Los defectos de los pacientes con acromatopsia difieren de los que presentan los monos con lesiones de V4. Los pacientes no pueden discriminar tonos, pero sí formas y texturas, mientras que la capacidad de los monos para diferenciar las formas es muy reducida pero la discriminación de los tonos se halla mínimamente afectada. Por tanto, es poco probable que el área identificada en el cerebro

humano pueda compararse directamente con la región V4 del mono, pues parece abarcar regiones más amplias, entre ellas la corteza temporal inferior.

Podemos reconocer y recordar una variedad casi infinita de formas con independencia de su tamaño o posición en la retina. Los estudios clínicos efectuados en el humano y los experimentales llevados a cabo en monos indican que el reconocimiento de la forma está íntimamente ligado con procesos que tienen lugar en la corteza temporal inferior. El reconocimiento de los rostros y de otras formas complejas depende de ésta.

Las propiedades de respuesta de las células de la corteza temporal inferior son las que serían de esperar en un área que interviene en una fase tardía del reconocimiento de los patrones, por ejemplo, el campo receptivo de casi todas las células incluye la región de la fovea, en la que se hacen las discriminaciones finas. A diferencia de las células de la V1 y de muchas otras áreas visuales extraestriadas, las existentes en el área temporal inferior no muestran una clara organización retinotópica y sus campos receptivos son muy grandes, de forma que a veces pueden abarcar la totalidad del campo visual. Estos campos tan grandes podrían estar relacionados con la invarianza de posición, o capacidad para reconocer la misma característica en cualquier lugar del campo visual. Por ejemplo, el mismo movimiento simplemente desplazaría la periferia hacia el interior del campo receptivo de una neurona temporal inferior. Este gran campo receptivo de muchas regiones extraestriadas, entre ellas la temporal inferior, podría ser importante en lo que concierne a la capacidad para reconocer el mismo objeto, sea cual sea su localización.

Las aferencias visuales más importantes que llegan a la corteza temporal inferior proceden de V3 por lo que no debe sorprender que continúe el proceso visual ya observado en aquella. Parece que la corteza temporal inferior posee subregiones funcionales y que, como en V4, puede tener vías distintas para estas regiones. También como en V4 sus células son sensibles tanto a la forma como al color. Muchas células de la corteza temporal inferior responden a distintas formas y colores, aunque la potencia de la respuesta varía según las distintas combinaciones de estos dos atributos (Komatsu e Ideura, 1993). Otras células sólo son sensibles a la forma o al color.

Resulta muy interesante el hallazgo de que algunas células inferotemporales sólo responden a tipos específicos de estímulos complejos, como una mano o una cara. Para las células que responden a una mano, cada uno de los dedos constituye una característica visual especialmente esencial; estas células no responden cuando no hay espacios que separen los dedos. Sin embargo, cualquier orientación de la mano despierta una respuesta similar. En cuanto a las neuronas selectivas de los rostros, la visión frontal de la cara es el estímulo más efectivo para algunas, mientras que para otras o es la visión lateral. Además, así como algunas neuronas responden preferentemente a los rostros, otras lo hacen a expresiones faciales concretas. Aunque la proporción de células de la corteza temporal inferior que responden a las manos o a los rostros es pequeña, su existencia, junto con el hecho de que las lesiones de esta región ocasionan defectos específicos del reconocimiento de los rostros indican que la responsable del reconocimiento facial es la corteza temporal inferior.

Uno de los aspectos más importantes en el conocimiento del análisis cerebral de los objetos complejos es el grado con el que cada célula individual responde a los componentes más simples de estos objetos. Algunos elementos esenciales de los rostros bastan para activar ciertas neuronas temporales inferiores. Por ejemplo, en lugar de una cara, dos manchas y una línea colocadas adecuadamente pueden activar a la célula (Kobatake y Tanaka, 1994). Otros experimentos sugieren que algunas células responden a dimensiones faciales y otras, a la familiaridad de la cara. También hay pruebas de que las células que responden a características similares están organizadas en columnas.

La identificación de tales vías se ha logrado gracias a la información obtenida de disfunciones cognoscitivas visuales, ya sea por lesión experimental o por observación clínica; en las cuales se ha observado la incapacidad para distinguir ciertos atributos del mundo visual. Sin embargo, los destinos de ambos sistemas, el P y el M por un lado y el qué y el dónde por otro, han acabado fuertemente cohesionados. Además todavía no hay un consenso del cómo, dónde y en qué momento la información visual es segregada, de hecho investigaciones recientes proponen que la segregación funcional, está modulada por la distribución laminar de las células y la forma en que éstas determinan conexiones, ya sea de tipo laterales (dentro de la misma lámina), ascendentes o descendentes.

Para estudiar y definir las conexiones anatómicas relativas al input hacia las áreas visuales, se han utilizado básicamente cuatro métodos de investigación.

El primero consiste en lesiones corticales, provocando la degeneración de los axones de las células destruidas. Así las fibras se vuelven más argentófilas y más fáciles de detectar por medio de tinciones de plata y por medio de exámenes en las consecuencias de comportamiento. Este método proporciona un panorama funcional, pero poco puntual anatómicamente hablando.

En el segundo se procede a inyectar pequeñas cantidades de un aminoácido radiactivo en la corteza cerebral. Este aminoácido es captado por las células de la corteza y desplazado a lo largo de los axones hasta sus terminaciones, pudiendo ser detectadas en toda su longitud por los procedimientos técnicos adecuados. O bien, técnicas de tinción como la mielina (Nissl).

También se ha facilitado la identificación de algunas áreas utilizando información sobre características fisiológicas proveniente de propiedades de campo de neuronas por estimulación eléctrica focal. Así la electrofisiología ha sido la que más datos ha arrojado ya que proporciona una alta resolución temporal en el orden de los milisegundos a partir de la cual se pueden generar mapas anatómico-funcionales.

Para identificar: *Conectividad* (encontrar patrón característico de inputs-outputs dentro de cada área cortical) y *Arquitectura* (usado para mapear V1, V4 y MT (temporomedial, V5). La combinación de éstas técnicas resultan en estudios de *Organización Topográfica* que es el mapeo ordenado del campo visual dentro de cada área, según su anatomía o fisiología. Aproximadamente la mitad de las áreas visuales identificadas muestran organización topográfica. Con estas técnicas puede estudiarse la distribución de las proyecciones tanto progresivas como retrógradas.

Por último, dentro de los métodos más utilizados están los estudios de imagenología (fMRI y PET) los cuales dan una resolución temporal relativamente buena en el orden de los segundos pero es un análisis muy grueso sin resolución anatómica fina.

Idealmente, cada área debería ser identificable independientemente utilizando todos los enfoques previamente mencionados. Sin embargo, en la mayoría se utilizó solamente uno de ellos. Ninguno responde a la distinción del lugar exacto, en el que se lleva a cabo, la segregación de las diferentes propiedades físicas y espaciales.

Esto pone de manifiesto la necesidad de encontrar una herramienta capaz de mostrar tanto anatomía, citoarquitectura y fisiología de una sola mirada para poder integrar la información dentro de un sistema funcional. Una herramienta ideal para comprender las bases celulares de la cognición sería una que brindara resolución celular para las respuestas de todas las neuronas del cerebro en tiempo real que permita el mapeo de la vía completa jerárquicamente hablando en el cual se distingan los nodos corticales funcionales (V1, V4 y V5), pero sobre todo, un análisis anatómico y funcional a nivel laminar.

Es necesario hacer un análisis detallado celular, que nos permita establecer la autonomía y sobrelape funcional a nivel laminar, columnar y por área.

8. catFISH: UNA HERRAMIENTA PARA EL ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD EN ENSAMBLES NEURONALES CON EXCELENTE RESOLUCIÓN ANATÓMICA.

Actualmente la detección de la expresión de los llamados *genes de expresión inmediata tempranos* (GEIT) después de la estimulación sensorial nos brinda un método de estudio de la actividad neuronal con resolución temporal en el orden de minutos y una resolución celular con capacidad de distinguir con certeza las unidades neuronales activas. Se le conoce a esta técnica como catFISH o *análisis compartamental de la actividad neuronal utilizando histología fluorescente*. Este método nos da información sobre la historia de actividad de células nerviosas a lo largo de todo el encéfalo. Da indicio de cuándo se activaron determinadas neuronas, dependiendo del compartimento celular en donde se detecte el transcrito del gen y permite la visualización, dentro del mismo cerebro, de grandes poblaciones neuronales involucradas en dos experiencias sensoriales o conductuales distintas (Guzowski et al., 1999; Waltereit et al., 2001; Vardasjanova et al., 2002; Vardasjanova y Guzowski, 2004).

Al realizar hibridación *in situ* fluorescente (ver apéndice I) para detectar el GEIT Arc en tejido obtenido de animales después de la estimulación conductual o sensorial, vemos que de dos a cinco minutos después de que ha ocurrido actividad neuronal robusta, el RNA mensajero (ARNm) de Arc aparece en el núcleo de las neuronas como dos discretos focos de transcripción genómica. Estos focos intranucleares persisten durante aproximadamente 16 minutos después de que se retira el estímulo y por lo tanto nos indican que a ocurrido actividad neuronal de 2 a 16 minutos antes del sacrificio. El ARNm es translocado subsecuentemente al citoplasma, donde puede ser detectado entre 20 y 45 minutos después de la actividad. Debido a que el cronograma de la detección de Arc con hibridación *in situ* fluorescente (FISH) en el núcleo es distinto al de la detección de la señal de Arc en el citoplasma, utilizando este método podemos inferir el historial de actividad de neuronas individuales en al menos dos distintas épocas de estimulación (Guzowski et al., 1999; Waltereit et al., 2001; Vardasjanova et al. 2002).

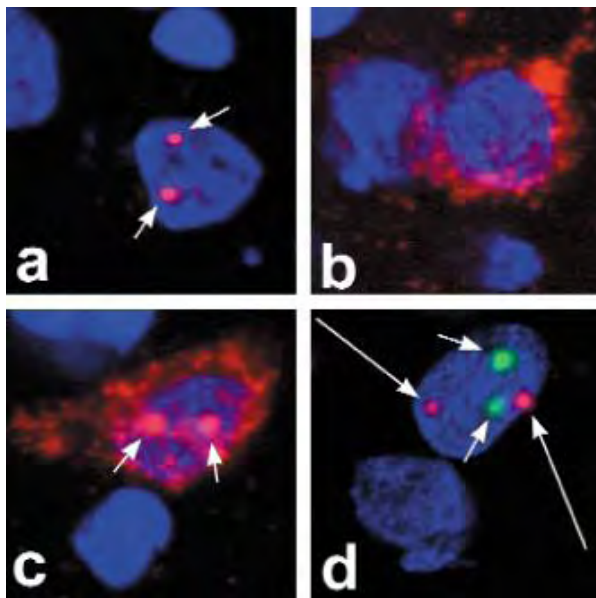


FIGURA 16. Perfiles de tinción utilizando catFISH. (a) Expresión de Arc intranuclear a los 5 minutos de estimulación. (b) Marcaje de ARN de Arc en citoplasma a los 20 minutos. (c) Célula doblemente marcada nuclear/citoplasmática. (d) Doble marcaje con Arc (verde) y zif268 (rojo). Modificado de Guzowski et al. (1999).

Para la neurociencia de sistemas, catFISH permite que las poblaciones neuronales activadas por dos experiencias conductuales sean visualizadas y comparadas en el cerebro del mismo animal. De esta manera, la naturaleza de dos tiempos de catFISH permite que se comparen mapas de actividad dentro de un mismo animal. Esta herramienta de imagenología permite estudiar las interacciones dinámicas y funcionales de poblaciones neuronales a través de todo el cerebro durante diferentes procesos cognitivos.

El método de catFISH permite identificar grupos de células que se activan ante uno u otro evento de exploración, o bien ante ambos. Esto permite evaluar la estabilidad de la red neuronal cuando se trata de dos eventos semejantes, en donde se espera que el mismo conjunto de neuronas se activen. De la misma

forma se puede medir el grado con el que un conjunto de células es capaz de discriminar dos eventos diferentes, lo que permite determinar qué grupos de células son capaces de distinguir diferencias, ya sean sutiles o salientes, entre dos eventos conductuales (ver figura 16).

Los genes de expresión inmediata se dividen en dos familias, los genes inmediatos de regulación transcripcional y los genes inmediatos efectores. Como ejemplo de genes inmediatos de regulación transcripcional están *c-Fos*, *c-Jun* y *Zif268*, cuya función es regular la expresión de otros genes cuyas proteínas cumplen importantes funciones en la célula, como BDNF entre muchos otros. Los genes de expresión inmediata efectores están representados por *Homer 1^a* y *Arc*; cuyas proteínas llevan a cabo importantes funciones celulares, *Homer 1a* está involucrado en la adición de receptores a glutamato (Ango et al., 2002) y *Arc* en la endocitosis de receptores AMPA y posiblemente en la modificación de la estructura citoesquelética de espinas dendríticas (Steward y Worley, 2001^a).

Aunque se pueden usar otros GEIs en catFISH, las ventajas de *Arc* son:

1. El RNA de *Arc* se expresa ubicuamente en prácticamente todo el SNC y se pueden encontrar reportes de su expresión asociada a la estimulación en varias regiones del cerebro como el hipocampo, la corteza (estriada, parietal, gustativa, visual, etc.), la amígdala, el estriado y otras.
2. Al compararse con otros GEIs tales como *Zif268* y *cFos*, la expresión de *Arc* brinda un muy bajo nivel de tinción basal (poco ruido de fondo) y su expresión tanto en el núcleo como en el citoplasma es transitoria, debido a que es transportado a las dendritas.
3. Se ha demostrado que el número de células que expresan el ARNm de *Arc* en el hipocampo y la corteza, correlaciona con el número de células que presenta campos receptivos espaciales, ambos en respuesta a una tarea de exploración espacial.
- 4.- También se ha demostrado que *Arc* en comparación a *Zif268* y *cFos* es más sensible a cambios en las demandas conductuales en tareas espaciales.
5. Finalmente, la proteína de *Arc* es importante para la plasticidad sináptica y la consolidación de la memoria, lo que puede ayudar a identificar células que tienen alta probabilidad de llevar a cabo cambios plásticos y que por lo tanto puedan formar parte de los circuitos neuronales que subyacen la representación de eventos en la memoria.

De esta manera vemos que la expresión de *Arc* puede ser utilizada adecuadamente como un indicador de actividad neuronal. La ventaja es que con catFISH obtendremos información anatómica fundamental. Así, podremos identificar las proporciones exactas de células activadas específicamente por la estimulación sensorial; además, esta estrategia nos permitirá caracterizar la capacidad de discriminación de los tipos de células que se activan en dichas condiciones conductuales, así como su ubicación en las láminas corticales, basado en el conocimiento de la transcripción del ARN (ver Apéndice II).

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

El número de células que aumentan su actividad electrofisiológica en respuesta a un evento conductual es el mismo que el de las células que expresan *Arc* (tanto la proteína como el ARN) en las mismas condiciones conductuales (Lyford et al., 1995; Steward y Worley, 2001b; Waltereit et al., 2001).

Wang et al. (2006), con el uso de una moderna técnica de imagenología confocal multifotónica en el cerebro vivo, observaron el incremento en la expresión de *Arc* a consecuencia de estimulación visual, utilizando estímulos con diferentes orientaciones. Entre otras cosas, encontraron que la identificación de la actividad celular con *Arc* por estímulos visuales con orientación específica coincidía precisamente con datos electrofisiológicos obtenidos con la misma estimulación. Estas observaciones muestran que la detección de la expresión de *Arc* en la corteza cerebral correlaciona adecuadamente con el incremento en la tasa de disparo de las neuronas durante la estimulación.

Por lo tanto catFISH, brinda una oportunidad única y sin precedentes para examinar cuáles y qué tipo de células se activan dependiendo de las características físicas y

espaciales del estímulo, permitiéndonos distinguir cuándo, cuánto y dónde divergen las dos vías de procesamiento visual. Así pues se podrá identificar de una sola mirada y con la mejor precisión anatómica posible las neuronas de V1 implicadas que se activan por estímulos visuales.

El método histológico de catFISH se ha desarrollado precisamente para complementar datos electrofisiológicos y proveer la posibilidad de realizar un mapeo anatómico detallado y completo de la actividad neuronal relacionada a la conducta. Por lo tanto, obtendremos un panorama integral de la ruta que sigue la información visual en el primate, encontrando Arc citoplásmico en células activadas por un primer estímulo con características psicofísicas del “qué” y Arc nuclear en células que respondan a características espaciales del “dónde”. Y la colocalización indicará los sitios que se activaron ante ambas características, dado que V1 es el centro repartidor de la información visual que proyecta hacia la vía temporo-occipital, o bien, hacia la parieto-occipital; se espera encontrar una alta colocalización.

Es preciso desarrollar una estrategia metodológica que permita identificar por separado el transcrito nuclear de *Arc* de la translocación en el citoplasma celular, después de un sólo ensayo de 5 minutos de estimulación visual 30 minutos después una segunda estimulación. Así podremos identificar con claridad las células que activaron ante uno u otro evento, o bien, ante ambas estimulaciones utilizando una sonda completa de este gen. Es decir estandarizar catFISH en tejido de mono para lo cual es necesario diseñar una sonda (ver Apéndice III).

Hay que señalar que esta técnica es altamente sensible y específica, así como el gen *Arc*, que ha sido vinculado en procesos tan importantes para la adaptación de los organismos como lo es la plasticidad cerebral, presente en la mayoría de los organismos a lo largo de la escala filogenética, haciendo a catFISH una herramienta muy poderosa en las neurociencias para explicar problemas básicos, pero es sistemas complejos de redes neuronales muy sofisticadas, producto del aprendizaje.

HIPÓTESIS

H1: Es posible estandarizar la técnica de catFISH en tejido de mono verde.

H2: La cinética compartamental de Arc en células corticales de mono verde, será muy similar a lo descrito en la literatura con hipocampo de rata.

H3: En V1 el número de células con coactivación de Arc citoplásmico y Arc nuclear será grande, puesto que aún, no hay especialización de las dos vías de análisis.

H4: En V4 habrá una mayor número de neuronas con Arc citoplasmático, ya que es el nodo cortical asociado a la identidad del objeto.

H5: En V5 habrá una mayor cantidad de neuronas con Arc nuclear, ya que es el nodo cortical especializado en la ubicación espacial dentro del campo visual.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo es determinar la ubicación y la cantidad de neuronas en V1, V4 y V5 que responden, expresando el gen de expresión inmediata Arc, a patrones de estimulación que representan la identidad y la posición (qué vs dónde) de un estímulo visual.

Así como caracterizar la actividad máxima y temporal de Arc en mono comparada con el hipocampo de la rata. Esta actividad está completamente descrita en el hipocampo de la rata, hasta la fecha hay diversos trabajos asociados al papel funcional en la plasticidad neuronal como producto del procesamiento cognitivo, arrojando datos muy importantes dentro de las neurociencias, sin embargo, en mono verde no se tiene ningún antecedente.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Estandarizar el método histológico de catFISH en primates, para lo cual es necesario:
 - a) Obtener la sonda y montar los procedimientos histológicos de hibridación in situ fluorescente para la detección de Arc en el tejido cortical de mono.

- b) Caracterizar la cinética compartamental temporal de Arc en mono.
- 2) Diseñar la metodología de estimulación que incluye programación de los dos tipos de estímulos y la distancia de presentación.
- 3) Planear y ejecutar el procedimiento quirúrgico del mono para la extracción de tejido congelado fresco.
- 4) Mapear la actividad neuronal por zonas corticales mediante un análisis densitométrico.

Cuantificar en número de neuronas que expresan Arc nuclear y citoplasmático en V1, V4 y V5.

MÉTODO

a) Sujetos:

Un mono verde (*Chlorocebus pygerythrus*) de 4 años de edad, con 3.82 kg. de peso con un parche negro en un ojo, éste ojo suprimido de estimulación, así como sus proyecciones corticales, se consideran el control negativo. Correspondiente a sujeto experimental (A).

Otro mono verde de 6 años de edad, con 4.95 kg. de peso bajo una preparación de choques electro-convulsivos para generar una activación masiva de la corteza como control positivo (B).

b) Preparación del animal:

Inmovilización estereotáxica, ambos animales fueron previamente craneotomizados y permanecieron con el cerebro expuesto para su rápida extracción. Las meninges fueron humectadas constantemente con solución rigger. Se mantuvieron con respirador artificial y anestesiados con gas (ver Apéndice IV).

c) Procedimiento de estimulación:

Sujeto A (estimulado).

Se llevó a cabo una única sesión en donde al animal se le presentó un estímulo visual que genera una figura (ver estímulo 1) durante 3 min. Después hubo un periodo de 30 min. antes de presentar la segunda estimulación, el cual fue un estímulo que genera un flujo espacial en movimiento (ver estímulo 2). Inmediatamente después de la última tarea se extrajo el cerebro del al animal.

Diseño de estímulos:

El Sistema visual puede analizar e interpretar estímulos definidos por cualquiera de los siguientes atributos: textura, movimiento y disparidad binocular. En estudios de percepción, a estos factores se les denomina de segundo orden, siendo el primero la luminosidad.

Los estímulos diseñados para el presente estudio tienen las mismas características en primer y segundo orden, además de un horizonte virtual; uno genera la percepción de un objeto (caballo) y el segundo es una simulación de locomoción en una ruta lineal a través de un ambiente visual (Fig. 18).

Ambos estímulos se presentaron en un monitor estándar RGB de 12 pulgadas con una resolución de 1024 x 768 pixeles, 60 Hz . Se ajustaron para abarcar 20 grados del campo visual; correrán durante 3 minutos cada uno con intervalo entre estimulación de 30 minutos en una sola exposición.

Para asegurar que el mono enfoque el estímulo bajo anestesia, se mandaron hacer unos lentes para que la distancia focal correspondiera a 40 centímetros, para estimular 24° del campo visual (ver figura 17). Se utilizó la fórmula $\text{tangente} = y/x$.

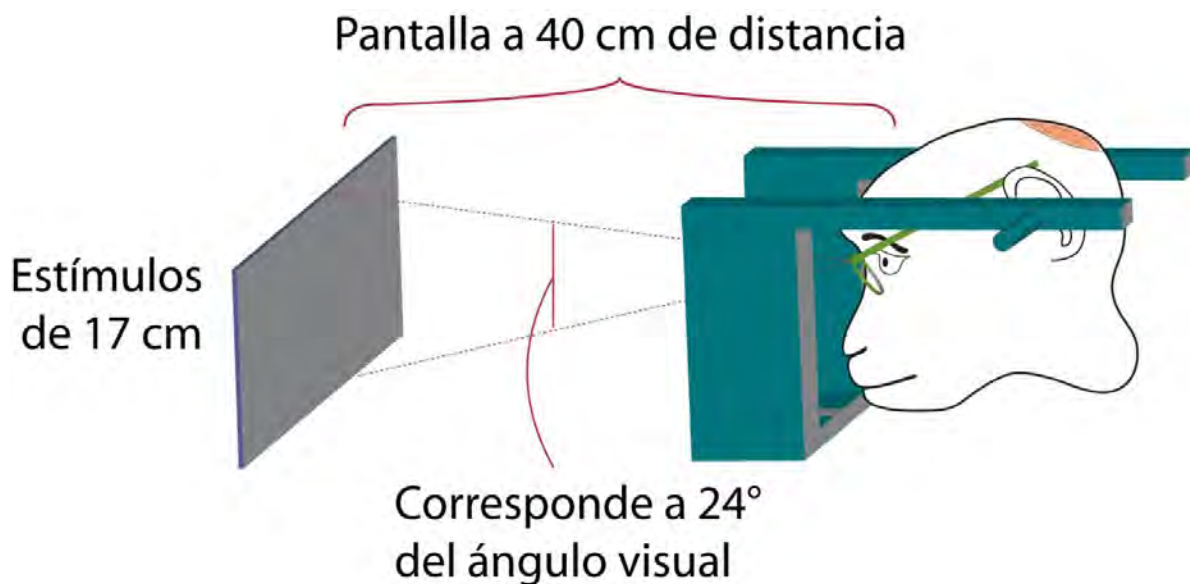


FIGURA 17. Caricatura de estimulación. Se muestra la preparación del animal y las medidas utilizadas para estimular 24° del campo visual en la fovea.

Estímulo 1: Caballo

Se eligieron secuencias que representan el movimiento y la silueta característicos de un caballo. Se tomaron 8 imágenes representativas para presentarse en secuencia, simulando el trote del animal cruzando la pantalla de izquierda a derecha (ver figura 19).

El fondo del estímulo consiste de 50% puntos negros y 50% blancos al azar. Cada punto está formado por un píxel (ver figura 20). Para distinguir el estímulo, a medida que se presenta la secuencia, los puntos ubicados dentro del área definida por la silueta invierten su polaridad. La secuencia del trayecto completo tiene una duración de 16 cuadros y corre a 15 cuadros por segundo. Basado en Bellefeuille y Faubert (1998).

Estímulo 2: Flujo Óptico

Es una simulación de locomoción a través de un entorno visual que consiste en un plano de tierra texturizado de la misma manera que el estímulo anterior (puntos blancos y negros al azar). El movimiento sigue una trayectoria recta hacia un horizonte virtual con una inclinación de 35°. Se basa en un ciclo repetitivo de 45 cuadros que corre a 15 cuadros por segundo (ver figura 21). Basado en Wilkie y Wann (2005).



Fig. 18 Fondo texturizado; en la parte superior se observa el horizonte virtual.

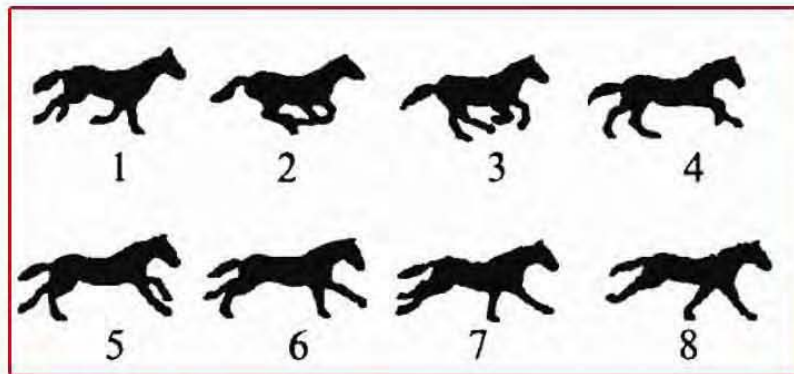


Fig. 19 Secuencia de caballo corriendo.

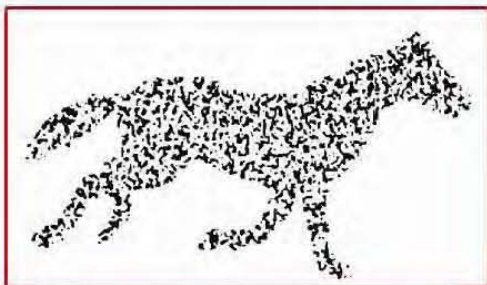


Fig. 20 Silueta texturizada (polaridad invertida) del caballo.



Fig. 21 Optic Flow, las líneas representan el ángulo de inclinación.

Sujeto B (control positivo).

La preparación del sujeto fue la misma que para el sujeto experimental excepto por la estimulación. Se utilizó un Estimulador marca Grass® modelo S11 de dos canales independientes, conectados a una unidad SIU6 de corriente constante de 100 Hertz, se le aplicaron pulsos de 1 segundo de duración a intensidad de 15 miliamperios en trenes de de 6 segundos de duración, preparación denominada MECS por sus siglas en ingles (massive electroconvulsive shocks), Para evitar accidentes durante la estimulación de electrochoque, tres minutos antes, se le administró 2 mg/kg de Flaxedil (curare) por vía intravenosa para inhibir el componente motor de la convulsión generada, es decir, decrementar la severidad del espasmo muscular tetánico, paraplegia espasmica y otros estados convulsivos, ya que este fármaco es un bloqueador competitivo de los receptores colinérgicos en el músculo.

El sujeto estuvo monitoreado en todo momento electrocardiográficamente y electroencefalográficamente, se mantuvo con respiración artificial y se sacrificó a los 30 minutos después de la estimulación, para obtener la cinética citoplasmática de Arc.

d) Obtención y procesamiento de los tejidos cerebrales:

Se retiraron las meninges para luego extraer el cerebro que se congeló rápidamente en una solución de 2-methyl-butano enfriada mediante un baño en alcohol etílico y hielo seco. Posteriormente, el animal fue sacrificado con pentobarbital (20mg/kg).

El cerebro fue seccionado gruesamente con el uso de una matriz para sección (Electrón Microscopy Sciences®) y se seleccionó toda la porción correspondiente a V1 en la cual está representada la fovea, es decir, entre el surco occipital inferior y el surco lunar. En un molde de plástico se colocaron los tejidos experimental (estimulado visualmente), control negativo (contralateral al experimental) y control positivo (mecs) respectivamente, viendo la cara lateral interna hacia la base del molde, el cual se cubrió con “Tissue tek OCT®” para generar un bloque sólido. Estos fueron seccionados en un criostato, obteniendo todos los cortes horizontales posibles de 20 µm de grosor (ver figura 22). Cada corte se montó directamente en la laminilla, las cuales son marcadas serialmente y se anotaron todos aquellos cortes perdidos, para mantener conocimiento preciso de la ubicación.



FIGURA 22. Tejido montado en el criostato para ser seccionado a 20 μm de grosor.

e) **Hibridación *in situ* Fluorescente:**

En primer lugar, la muestra de tejido montado se *desnaturaliza*, proceso que separa las hebras complementarias de la estructura en doble hélice del DNA. A la muestra desnaturalizada se le añade entonces la sonda de interés, marcada con un fluoróforo, que se asociará al ARNm de la muestra en el sitio diana, en el proceso denominado *hibridación*, donde se vuelve a formar una doble hélice (ver Apéndice V).

Se realizó la síntesis de la sonda de ARN a partir de un templado de ADN de humano obtenido de un plásmido diseñado en el laboratorio del Dr. Paul Worley, contenido en el plásmido pSPORT II sin promotor, por lo cual fue necesario subclonarlo al plásmido pBluescript II KS+. Se utilizaron plásmidos que contienen secuencias de ADN probadas para la fabricación de sondas de ARN, que detectan *Arc* completo. Los plásmidos fueron cortados respectivamente con enzimas de restricción (FspI para la sonda antisentido de *Arc* y NotI para la sentido) para linealizarlos.

Como el tejido de mono tiene una gran autofluorescencia natural producto de lipofuscina, el tejido se trató previamente con Acido pícrico al 2% y posteriormente se prosiguió con el método oficial de cat-FISH.

Se tomaron 7 muestras representativas a lo largo de la proyección cortical de la fovea en V1, correspondientes a 3 mm que mide la fovea, ± 1 mm en series de 3 cortes seguidos cada 40 cortes para el hemisferio experimental (Guld y Bertulis, 1976; Bertulis et al., 1977; Van Essen y Zeki, 1978; Zeki, 1978; Dow et al., 1981; Dow et al., 1985; Heinen y Skavenski, 1991; Adams y Horton, 2003).

Para los hemisferios controles se tomaron 1 muestra cada 40 cortes, equiparables a la misma altura del experimental (ver figura 23 y 24).

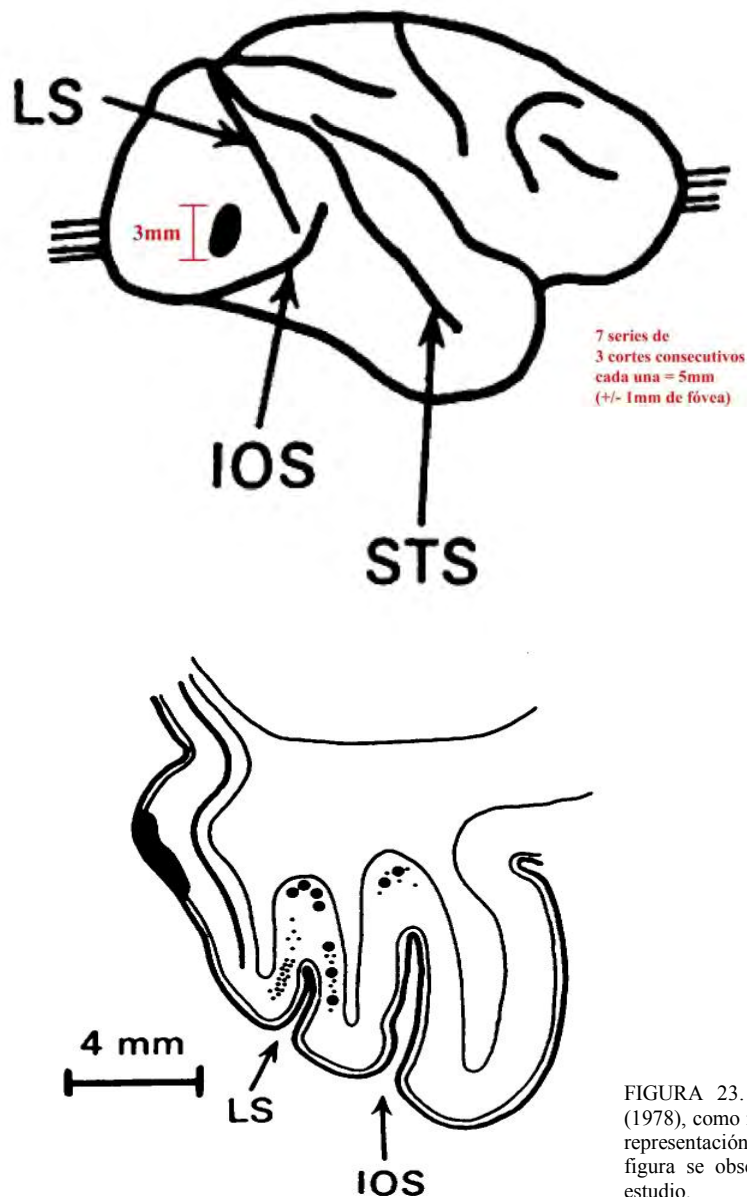


FIGURA 23. Mapa retinotópico. Modificada de Zeki (1978), como referencia anatómica utilizada para ubicar la representación foveal en V1. En la parte superior de la figura se observa el muestreo tomado para el presente estudio.

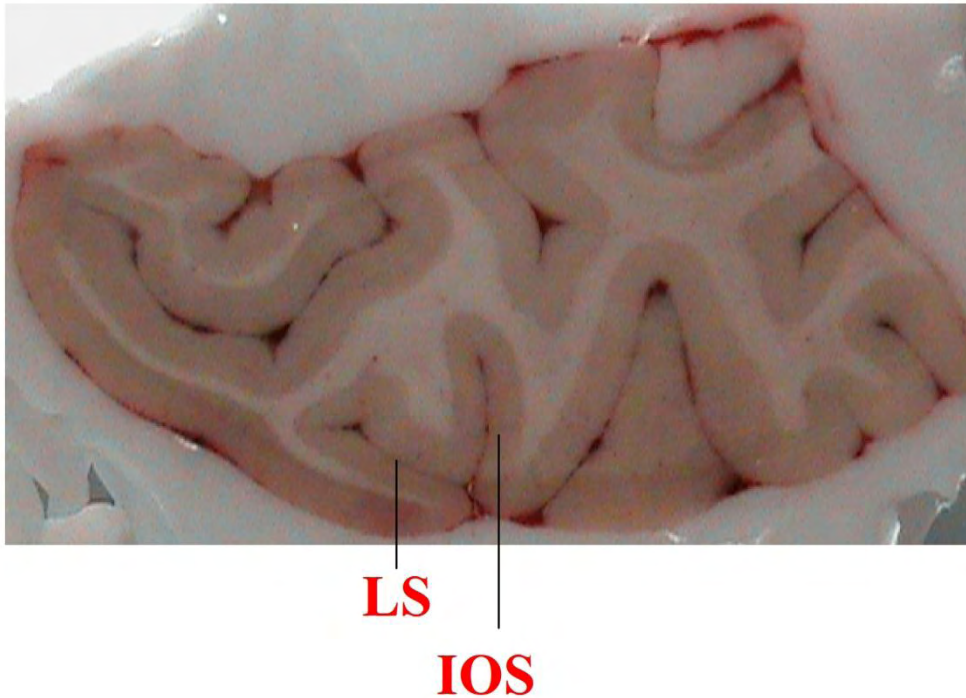


FIGURA 24. Fotografía de sección horizontal de la corteza visual de mono verde a la altura donde empieza la fóvea (Surco Lunar y Surco occipital interno).

f) Microscopía:

La señal emitida por la sonda se observa mediante un microscopio de fluorescencia y así la muestra de ARN se puede clasificar según la presencia o ausencia de la señal.

- 1) Se utilizó un microscopio Apotome© modelo Imager.Z1 marca Zeiss® para obtener imágenes panorámicas y observar la activación completa de la corteza visual con un objetivo 10x, se obtuvieron un promedio de 30x25 cuadros parciales por imagen reconstruida completa.
- 2) Se utilizó un microscopio Confocal marca Zeiss® para obtener imágenes a 40x de los nodos representativos de cada área (V1 - fóvea, V4 - qué, V5 - dónde).

La definición de los parámetros de captura de las imágenes se establecieron con una zona del tejido cortical control y se mantuvieron estables para obtener las imágenes del resto de la corteza. Una vez definidos los parámetros de captura, se adquirieron imágenes en el eje Z. La resolución de cada plano de la imagen es de 1 μm de grosor y se obtienen

entre 14 y 18 planos útiles por imagen, lo que cubre entre 14-18 μm del grosor del tejido. Todas las muestras fueron analizadas bajo los mismos parámetros.

g) Análisis de las imágenes:

Para el análisis de imágenes de cada región se utilizan los apilados de imágenes obtenidas de ambos microscopios, en las cuales con el uso del programa Metamorph® se segmentan los núcleos de las células utilizando reglas de segmentación que ayudan a evitar problemas estéreo-lógicos (Guzowski, 1999; Vazdarjanova y Guzowski, 2004) y después se clasifican como: Tinción nuclear, Citoplasmática y Doble (citoplasmática y nuclear). Para la clasificación también se aplican reglas que evitan errores y problemas estéreo-lógicos descritos en detalle previamente.

- 1) Se hizo un análisis cualitativo por medio de densitometría para hacer un mapeo o tamizado de la actividad cortical.
- 2) Se obtuvo el estimado cunitativo de células incluidas en el estudio de cada una de las regiones, obteniéndose el número de células con *Arc* en el citoplasma, *Arc* en el núcleo y doble marcadas (citoplasmático y nuclear). Del total de células analizadas se calcula la proporción de células para cada clasificación por región. Es precisamente con esta cuantificación que podemos distinguir las células que responden a una tarea o a la otra. Se compararon las proporciones de células activadas en las diferentes regiones.

RESULTADOS

a) Diseño de sonda

El laboratorio del Dr. Paul Worley nos proporcionó la secuencia de ARC Full humano insertado en el plásmido pSPORT II (ver figura 25), de acuerdo con sus datos reportados. El mismo fue utilizado para catFISH en tejido de Mono Rhesus (macaca mulatta).

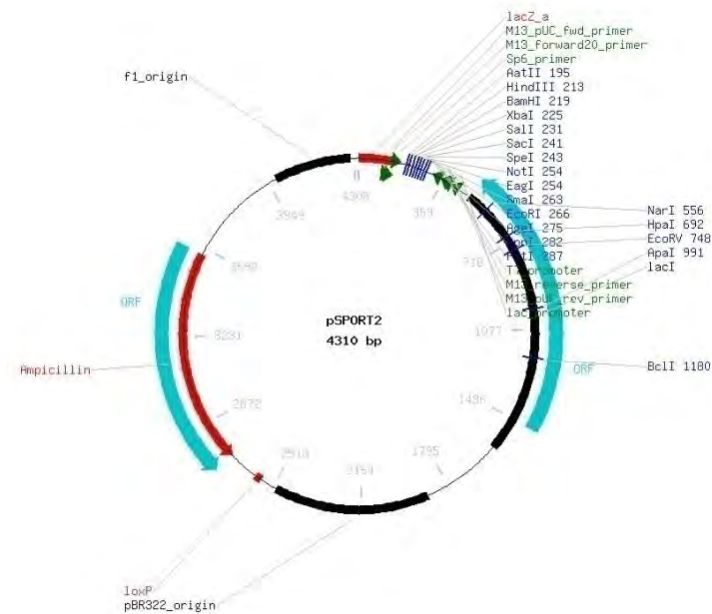
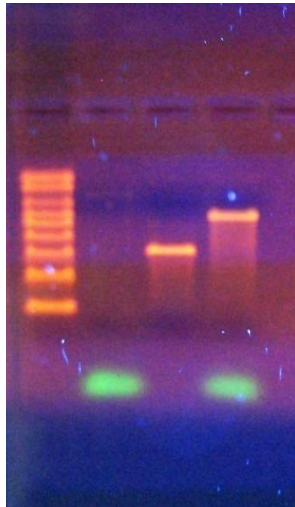


FIGURA 25. Mapa del plásmido donado.

Para el objetivo del presente trabajo fue preciso sintetizar sonda a partir del plásmido antes mencionado, el primer paso para lograrlo fue cortar con SalI para linearizar el plásmido y poder sintetizar la sonda antisentido con el promotor T7. Tras varios intentos, no se obtuvo sonda, sin embargo, en plásmidos controles bajo las mismas condiciones experimentales, si se obtuvo un buen producto, corroborando que el problema estaba en el plásmido pSPORT II.



CARRILES (izq- der)

1. Escalera 3 μ l
2. Sonda Arc Full Humano 2 μ l
2. Sonda Arc Intron Rata 2 μ l
3. Sonda Arc Full Rata 2 μ l

FIGURA 26. Fotografía de gel.

Era necesario determinar si el problema para sintetizar estaba en el vector o en el inserto, así se decidió, mandar a secuenciar con T7. Los resultados indicaron la presencia de ARC Full en el plásmido, de forma adecuada. Lo rojo corresponde a la secuencia de Arc Full Human.

CCTGNGGTCCGGTCGGATTCCAGGTCGNCCACGCGTCCGCGGACGCGTG
 GGCCGCAGCAGCCGAGCCGGACTGCCTCCCCGGGCGTGCTCCGCCGGCCCCGC
 CGCCGGCCCGCAGCGACAGACAGGCGCTCCCCGCAGCTCCGCACGGGACCCAG
 GCCGCCGGACCCAGCGCCGGACCACCGTCCGTCCGCCCCGAGGAGTTTGCCG
 CCTGCCGGAGCACCTGCGCACAGATGGAGCTGGACCACGGACCAGCGGCGGGC
 TCCACGCCTACCCCGGGCCGCGGGGCGGGCAGGTGGCCAAGCCCAACGTGATC
 CTGCAGATCGGGAAGTGCCGGGCCGAGATGCTGGACACGTGCGGCGGACGCAC
 GGC ACTGCTGGCCGAGGTGTCCAAGCAGTGGAGCGCGACTGAAGGGGCTGCAC
 GGTCGGTCGGGAACTGGAGACA ACTGGACGGCTACGTGCCACGACGATCCACG
 CTGGAAGAATCCATCAAGGCTGNCTGTGCCCTTGCAAGAAAACATCGCCA ACT
 GANCGTTGGTCAACCGANATGACTGTGG

Por otro lado se diseñaron oligos internos que secuenciaran los extremos 5' y 3' del inserto para verificar que el plásmido pSPORT II estuviera en condiciones óptimas. Los parámetros establecidos para su diseño fueron:

- El tamaño usual para los oligos es de 18-25 nucleótidos, la diferencia del tamaño entre un par de oligos no debe ser de más de 3 bases.
- El contenido de GC debe estar entre 40-60%, con una distribución homogénea entre las 4 bases.
- Evitar las secuencias repetidas invertidas y la autocomplementaridad para evitar estructuras secundarias de horquillas.
- El extremo 3' no debe ser capaz de unirse a ninguna parte par de oligo.
- De preferencia debe tener una A al final.
- La temperatura de alineamiento no debe diferir más de 5°C entre el par de oligos.
- El oligo *forward* se diseña transcribiendo la secuencia 5'-3' directamente.
- El oligo *reverse* se diseña cambiando la secuencia completamente invirtiéndola.

Al analizar la secuencia se descubrió que la razón por la cual no se lograba sintetizar la sonda, era porque el sitio de unión a la polimerasa T7 era deficiente, además no existía la secuencia del primer Sp6 haciendo imposible la síntesis antisentido de la misma. Lo rojo corresponde a Arc dentro de las secuencias obtenidas, el resto es el vector pSPORT II, donde lo verde es T7 y lo azul Sp6.

Inicio

NNNNCNNCN**GCGGGGCCGGCGGAACACGCCCGGGGAGGCAGGTCCGGCTCGG**
CTGCTGCGGCCACGCGTCCGCGGACGCGTGGGTGACCCGGGAATTCCGGAC
 CGGTACCTGCAGGCGTACCAGCTTTCCCTATAGTGAGTCGTATTAGAGCTTGGC
 GTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCAC**AATTCC**
ACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAG
 TGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAA
 ACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGT

TTGCGTATTGGGCGCCAGGGTGGTTTTTCTTTTCACCAGTGAGACGGGCAACAG
CTGATTGCCCTTACCGCCTGGCCCTGAGAGAGTTGCAGCAAGCGGTCCACGCT
GGTTTGCCCCAGCAGGCGAAAATCCTGTTTGATGGTGGTTAACGGCGGGATAT
AACATGAGCTGTCTTCGGTATCGTCGTA TCCACTACCGAGATATCCGCACCANC
GCGCAGCCGGANTCGGTAATG

Intermedio

CTTCTTCAAGGAAANCATCGCCAACCTGGAAGCGCTGGGTCAAGCGCGAGATG
CACGTGTGGCGCGAGGTGTTCTACCGCCTGGAGCGCTGGGCCGACCGCCTGGA
GTCCACGGGCGGCAAGTACCCGGTGGGCAGCGAGTCAGCCCGCCACACCGTTT
CCGTGGGCGTGGGGGGTCCCGAGAGCTACTGCCACGAGGCAGACGGCTACGAC
TACACCGTCAGCCCCTACGCCATCACCCGCCCCAGCCGCTGGCGAGCTGCCC
GGGCAGGAGCCCGCCGAGGCCAGCAGTACCAGCCGTGGGTCCCCGGCGAGG
ACGGGCAGCCAGCCCCGGCGTGGACACGCAGATCTTCGAGGACCCTCGAGAG
TTCCTGAGCCACCTAGAGGAGTACTTGCGGCAGGTGGGCGGCTCTGAGGAGTA
CTGGCTGTCCCAGATCCAGAATCACATGAACGGGCCGGCCAAGAAGTGGTGGG
AGTTCAAGCANGGCTNCGTGAAGAACTGGGTGGAGTTCAAGAAAGAGTTCCTG
CAGTACAGCGAGGGCACGCTGTCCGAGAGNCATCCAGCGGACTGGACTGCNCA
AAACAGGCGAGCNCTGACATTN

Final

CTTGGGNACCTGGAGCCTGTGAAGANCCTGGAAACCTCATGAGGCTGTGGCCA
ACCCCTGCCCCTTGCCCCACACAGACCAGGCCTTAAATGTCGGTCCAGGCCCTG
TGCACCTTACCCAGAGACAGACTCTTTTTGTAAGATTTTGTTAATAAAACT
GAAACTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGGCGGCCGCTCTAGAGGATCCA
AGCTTACGTACGCGTGCATGCGACGTCATAGCTCTTCTATAGNGNCACCTAAAT
TCAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTA
CCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGNGTAATAGCG
AANAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAA
TGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACNCG
CANC GTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTANCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTT

CCNTNCTTTCTCGCCCGTTTCGCCGGNTTCCCGTCAGCTNNAATCGGGGGCTCC
 NTTAGGGTCCNATTAGAGTTNACG

Por lo tanto se decidió subclonar el inserto de Arc Full al plásmido pBluescript II KS, el cual, es utilizado en nuestro laboratorio cotidianamente puesto que en él se encuentra insertado tanto Arc como Homer 1a de rata y perfectamente dominada la técnica de cat

FISH.

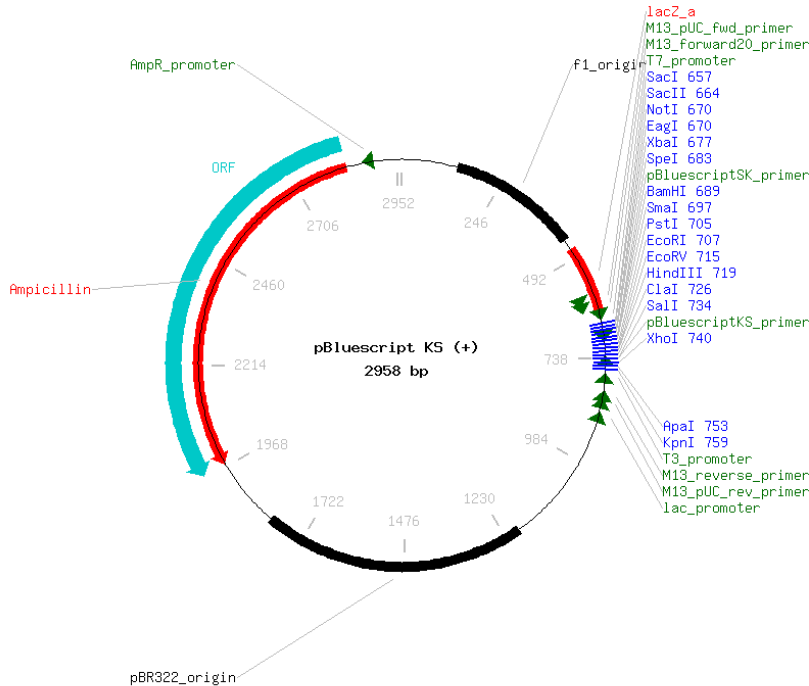
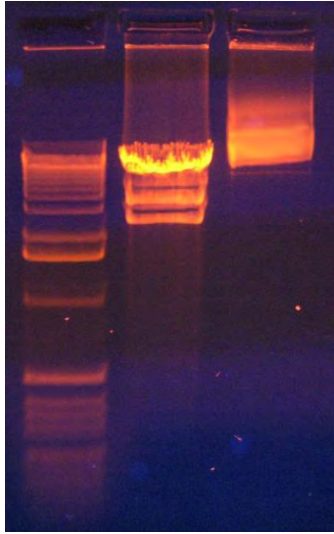


FIGURA 27. Mapa del plásmido utilizado.

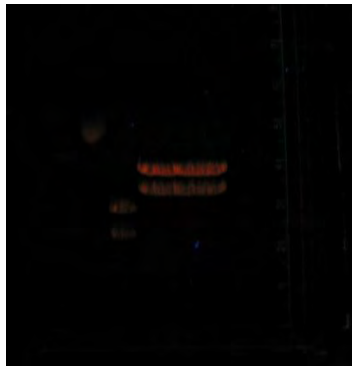
1. Se analizó qué enzimas cortaban ambos plasmidos con el software gratuito *Justbio* y rectificado en el *NBI BLAST Assembled Genomes* encontrando que para nuestro fin, era conveniente cortar con Xba1 y Kpn1, se comprobó la doble digestión por gel. Se corrió la muestra en un gel de agarosa al 1 %.

| CARRILES (izq- der) |
|---------------------|
| 1. Escalera 3 µl |
| 2. Cortado 5 µl |
| 3. Sin cortar 5 µl |

FIGURA 28. Fotografía de gel.



2. Ya que se comprobó la doble digestión, se corrió toda la muestra en un gel de agarosa al 0.8 %. Se cortó la banda de interés (3000 pb) para purificarla con un kit de Fermentas para purificación de bandas en gel.



CARRILES (izq- der)

1. Escalera 3 μ l

2. Doble digestión 5 μ l

FIGURA 29. Fotografía de gel.

3. Para unir el inserto de Arc Full purificado en el vector pBluescript II KS se puso toda la noche a 16° con polimerasa T4. Bajo 3 condiciones experimentales diferentes de concentración del inserto y una sin inserto como control negativo (ver tabla 1).

| CONDICION | 1/10 | 1/5 | CONTROL |
|-----------|------|-----|---------|
|-----------|------|-----|---------|

| | | | |
|-----------|------------|------------|------------|
| VECTOR | 2 μ l | 2 μ l | 2 μ l |
| INSERTO | 4 μ l | 2 μ l | - |
| BUFFER | 2 μ l | 2 μ l | 2 μ l |
| ENZIMA T4 | 2 μ l | 2 μ l | 2 μ l |
| H2O | 10 μ l | 12 μ l | 14 μ l |
| TOTAL | 20 μ l | 20 μ l | 20 μ l |

TABLA 1. Concentraciones para la ligación.

4. Se transfectaron células XLblue ultacompetentes con la ligación.

5. Se transformaron (crecieron) en placas con medio LB y ampicilina 100 μ g/ml. Como control usamos la reacción de XGAL 40 μ l e IPTG 15 μ l por caja, el plásmido confiere a las células resistencia a la ampicilina. Además, el plásmido incluye el gen de la β -galactosidasa y el promotor LacZ lo que permite seleccionar a las células por color: aquellas células transformadas con el plásmido sólo dan colonias azules porque tienen el gen de la β -galactosidasa completo y las células transformadas con el plásmido que tiene el inserto van a dar colonias blancas porque el gen de la β -galactosidasa está interrumpido (ver figura 31).

6. Se incuba toda la noche a 37° como se esquematiza en la figura 25 (Sambrock y Russel,2001).

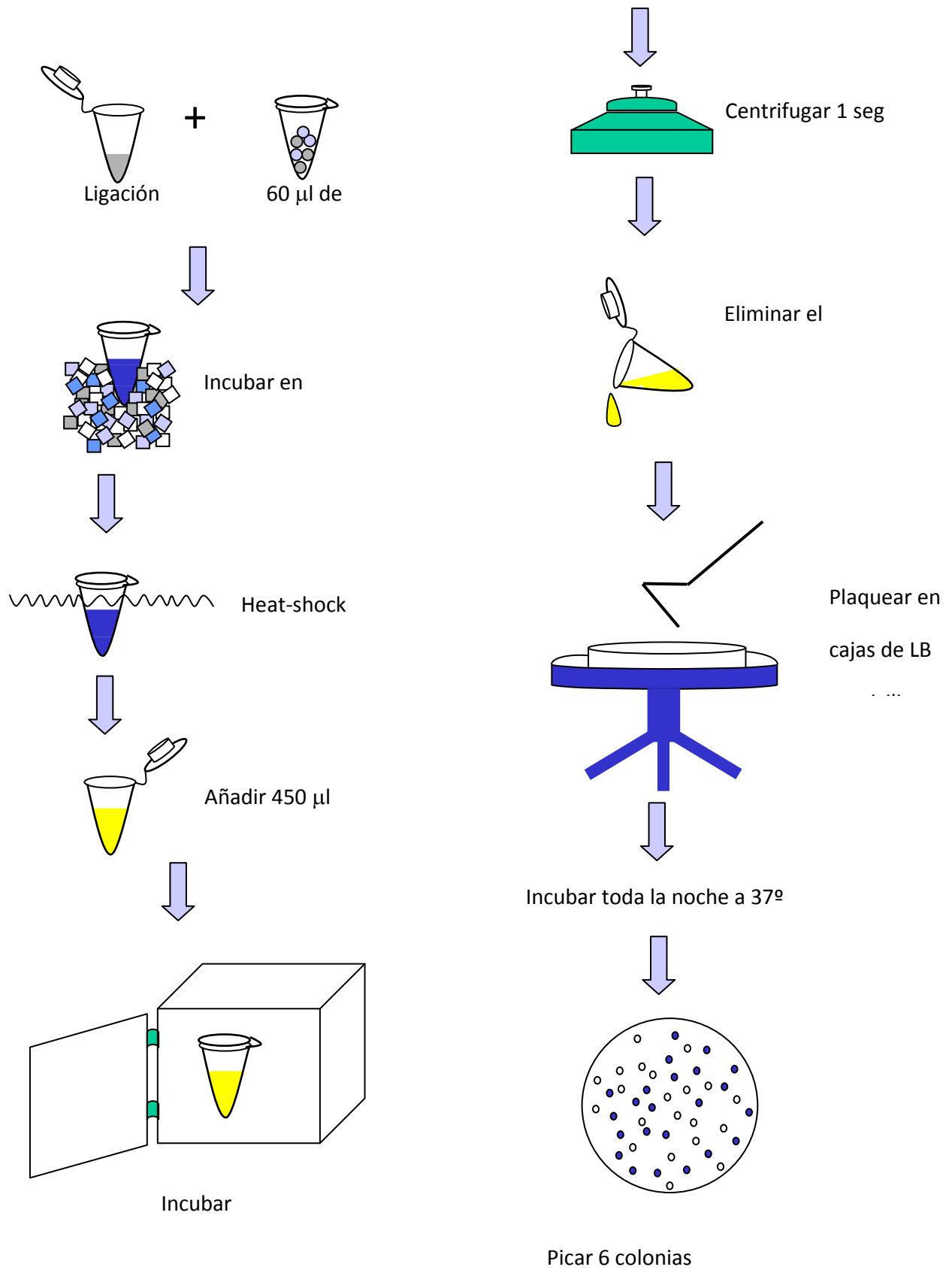


FIGURA 30. Protocolo de Transfección y Transformación.

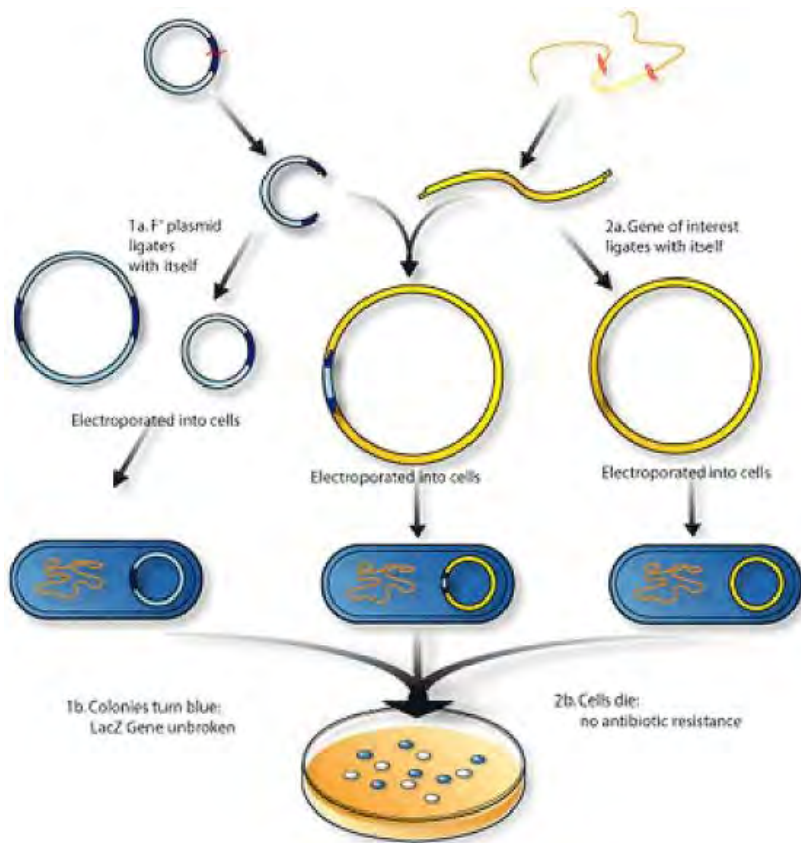


FIGURA 31. Caricatura que ejemplifica la reacción azul. Modificado de Sambrock y Russel (2001).

7. Se obtuvieron 6 colonias blancas en la caja de la relación 1/10.
8. Se pusieron a crecer 6 clonas blancas y 1 azul (control) en medio LB líquido toda la noche a 37° agitándose a 300 rpm.
9. Se realizaron minipreps para obtener los plásmidos, el aislamiento de DNA en plásmido por mini-prep es una técnica común pero de largo tiempo de preparación. Usualmente toma 2-3 horas producir de 12 a 24 muestras de DNA de tales cultivos bacteriales saturados. Para el procedimiento se utiliza la solución TENS (buffer TE que contiene 0.1 N NaOH y 0.5% dodecil sulfato de sodio), se cambia el acetato de potasio por acetato de sodio que es más comúnmente encontrado en laboratorios; se omite el tiempo de espera a temperatura ambiente. No se requiere la extracción de lisozima ni de fenol-cloroformo para este método. Con las modificaciones anteriores, el procedimiento se puede completar en 10

minutos. Se ha utilizado este procedimiento para generar hasta 18 muestras en no más de 30 minutos. La derivación de DNA de plásmido es alta (2 a 3 ug de 1.5ml de un cultivo) y la calidad es lo suficientemente buena para subsecuentes manipulaciones, tales como digestión de enzimas de restricción. La muestra también se puede utilizar para secuenciar tras un tratamiento con PEG y Range (Sambrock y Russel, 2001).

10. Se mandaron a secuenciar las 6 colonias con T7 para comprobar que la ligación se hubiese realizado con éxito.

11. Las 6 colonias tenían el plásmido pBluescript II KS con el inserto de Arc Full.

12. Se escogió solo una colonia (clona 5) para trabajar con ella, debido a que era la más completa y alineada con Arc full de humano. Se muestra el análisis donde Query es Arc Full Humano y Sbjct corresponde a la clona 5.

Score = 723 bits (376), Expect = 0.0
Identities = 411/424 (96%), Gaps = 3/424 (0%)

```
Query 3004 CCCAGAAGCCATGGCTCCTGGGG-CGCTTCC-AGGCATTCTGCCCTGCCCCGACACCAGA 3061
      ||||| ||||| || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 485 CCCAGAANCCATGGNTCATGGGGNCGCTTCCCAGGCATTATGCCCTGCCCCAACACCAGA 426

Query 3062 ACCCTGGTGTGGTGGGGCCACTAGCGTCTGCAGCCTAAGCAGGTGCTGGCTCAGGGTTCA 3121
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 425 ACCCTGGTGTGGTGGGGCCACTAGCGTTTGCAGCNTAAGCAGGTGCTGGCTCAGGGTTCA 366

Query 3122 TCGTTCTGCCTTGTCCACTGGGGGACCAGCCCTGCAGACCACTCTGACAAGTCTTCAGCC 3181
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 365 TCGTTCTGCCTTGTCCACTGGGGGACCAGCCNTGCAGACCANTNTGACAAGTCTTCAGCC 306

Query 3182 CACACCCTGCCAGCCCCACAGATTTTATTTTGCACATAAGCCATAACCAATCCTCAAGG 3241
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 305 CACACCCTGCCAGCCCCACAGATTTTATTTTGCACATAAGCCATAACCAATCCTCAAGG 246

Query 3242 CTGGCACAGGCTTTGGGGAAGCCCTGGAGCCTGTGAAGACCCTGGAAACCTCATGAGGC- 3300
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 245 CTGGCACAGGCTTTGGGGAAGCCCTGGAGCCTGTGAAGACCCTGGAAACCTCATGAGGCT 186

Query 3301 TGTGGCCAACCCTGCCCCCTGCCCCACACAGACCAGGCCTTAAATGTCGGTCCAGGCC 3360
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 185 TGTGGCCAACCCTGCCCCCTGCCCCACACAGACCAGGCCTTAAATGTCGGTCCAGGCC 126

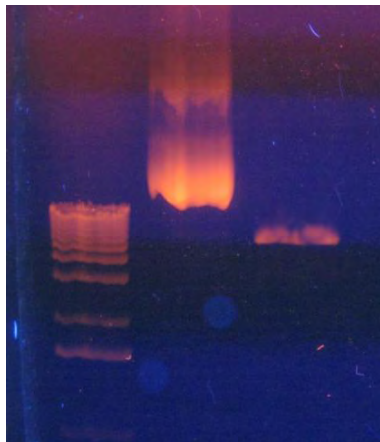
Query 3361 TGTGCACCTTACCCAGAGACAGACTCTTTTGTAAAGATTTGTAAATAAAACACTGAAA 3420
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 125 TGTGCACCTTACCCAGAGACAGACTCTTTTGTAAAGATTTGTAAATAAAACACTGAAA 66

Query 3421 CTTC 3424
```

13. Ya que se estará trabajando frecuentemente con este plásmido, se puso a crecer en medio LB para posteriormente realizar una maxi prep (kit).

14. Se dispuso a sintetizar la sonda, para lo cual, primero es necesario linearizar el plásmido, cortándolo con Kpn 1 para hacer la sonda antisentido con el promotor T7 y otra muestra independiente con Xba1 para hacer la sonda sentido con el promotor T3 de cada una, ya que la secuencia dice que el extremo 5' del inserto esta cerca de T7. Se dejó digiriendo toda la noche a 37°.

15. Se obtuvo el templado linearizado y se purifico mediante fenol cloroformo.



CARRILES (izq- der)

1. Escalera 3 μ l

2. Sin cortar 1 μ l

3. Templado 2 μ l

FIGURA 32. Fotografía de gel.

16. Se sintetizó sonda y no se obtuvo producto de ninguna de las dos reacciones.

17. Para verificar que el proceso de inserción no haya modificado la secuencia de unión a T7, se mandó secuenciar con los oligos internos nuevamente.

18. Las secuencias indicaron que tanto la región 5' como la 3' están perfectas, es decir, si hay secuencia T7 Y T3. Lo verde corresponde a Arc Full Humano.

Nc4 con t3 (arc human en BSK II)

TGGGTNCGGTCCGGATTCCCGGGTCGACCCACGCGTCCGCGGACGCGTGGGCC
GCAGCAGCCGAGCCGGACCTGCCTCCCCGGGCGTGCTCCGCCGGCCCCGCCGC
CGGCCCGCAGCGACAGACAGGCGCTCCCCGCAGCTCCGCACGGGACCCAGGCC
GCCGGACCCAGCGCCGGACCACCGTCCGTCCGCCCCGAGGAGTTTGCCGCCT
GCCGGAGCACCTGCGCACAGATGGAGCTGGACCACCGGACCAGCGGGCGGGCTC
CACGCCTACCCCGGGCCGCGGGGCGGGCAGGTGGCCAAGCCCAACGTGATCCT
GCAGATCGGGAAGTGCCGGGCCGAGATGCTGGAGCACGTGCGGGCGGACGCAC
CGGCACCTGCTGGCCGAGGTGTCCAAGCAGGTGGAGCGCGAGCTGAAGGGGCT
GCACCGGTTCGGTTCGGGAAGCTGGAGAGCAACCTGGACGGCTACGTGCCACGA
GCGACTCGCAGCGCTGGAAAAATCCATCAAGGCCTGCCT

Nc1 con t7 (arc human en BSK II)

CNATGGACTTCCCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAGCGGCCGCCCTTTTTTTTTTTT
TTTTTTTTGAAGTTTCAGTGTTTTATTAACAAAATCTTACAAAAGAGTCTGTCT
CTGGGGTAAGGTGCACAGGGCCTGGACCGACATTTAAGGCCTGGTCTGTGTGG
GGCAAGGGGCAAGGGGTTGGCCACAGCCTCATGAGGTTTCCAGGGTCTTCACA
GGCTCCAGGGCTTCCCCAAAGCCTGTGCCAGCCTTGAGGATTGGTTATGGCTTA
TGTGCAAAAATAAAATCTGTGGGGCTGGCAGGGTGTGGGCTGAAGACTTGTC
NAGTGGTCTGCAGGGCTGGTCCCCAGTGGACAAGGCAGAACGATGAACCCTG
AGCCNGCACCTGCTTAGGCTGCAGACGCTAGTGGCCCACCAGCACCCAGGGTT
TCTGGGTGTTGGGGGCAGGGCAAAATGCCTTGNAAACNCCCCAAGAGCCATGG
CTTCTGGGAAATGAACTTCCTGGAACCTGAACTNAAGGCTTGCTG

Nc3 b (oligo final)

TTTGGGGAN CCTGGAGCCTGTGAAGACCTGGAAACCTCATGAGGCTGTGGCCA
ACCCCTGCCCTTGCCCCACACAGACCAGGCCTTAAATGTCGGTCCAGGCCCTG
TGCACCTTACCCAGAGACAGACTCTTTTTGTAAAGATTTTGTTAATAAAACT
GAAACTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGGCGGCCGCTCTAGAGCGGCCGC
CACCGCGGTGGAGCTCCAATTCG **CCCTATAGTGAGTCGTATTA**CGCGCGCTCAC
TGCCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTA

ATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCC
GCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCG
CCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGAC
CGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTTC

T7: TAATACGACTCACTATAGGG (complementaria)

Nc2 a (oligo inicio)

GNNCGCGCGGGGCCGGCGGANCCGCCCGGGGAGGCAGGTCCGGCTCGGCTGCT
GCGGCCACGCGTCCGCGGACGCGTGGGTCGACCCGGAATTCCGGACCGGTA
CCCAGCTTTTGTTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGG
TCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATA
CGAGCCGGGAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACT
CACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTG
CCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGGCGGTTTGCGTATTG
GGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGGCTGC
GGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCA
GGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGNCAC

T3: CCCTTTAGTGAGGGTTAATT

19. Se decidió linearizar cortando dentro de nuestro inserto, puesto que ya se comprobó que está integro, se buscó enzimas que cortan dejando extremos romos. Se optó por la enzima FspI que corta en la Kb 195 obteniendo el mayor producto posible.

20. Se sintetizó sonda sentido y antisentido.

b) Estandarización de catFISH

Se realizaron varias hibridaciones, pero la señal era poco visible debido a que las muestras contenían mucho ruido de fondo. Al observar el tejido sin ningún tratamiento,

previo a la hibridación, nos percatamos de que autoflorescía naturalmente, como producto de la lipofuscina que se acumula en el citoplasma de las células del Sistema Nervioso Central resultado de la edad. Como se observa en la figura 33, la lipofuscina se manifiesta en pequeñas estructuras intracelulares punteadas (Schnell et al., 1999).

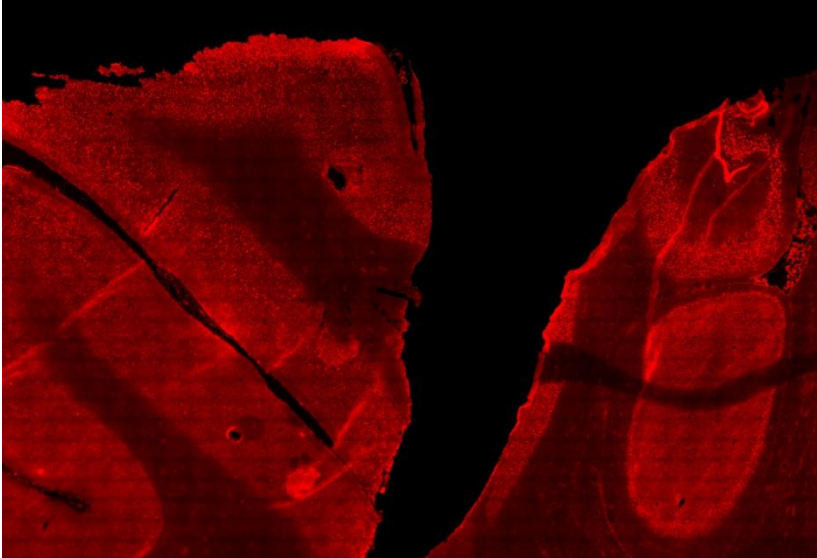


FIGURA 33. Fotografía de V1 de mono verde con autofluorescencia.

Tras analizar diversos métodos para eliminar la autofluorescencia se decidió utilizar Ácido Pícrico ya que se ajustaba a los requisitos de cat-FISH (Cowen et al., 1985; Mosiman et al., 1997; Victoria et al., 1997; Neumann y Gabel, 2002).

- 1) Montaje congelado fresco.
- 2) Fijación con Paraformaldehído.
- 3) Ibridación *in situ* fluorescente.



FIGURA 34. Fotografía donde se muestra que se eliminó notoriamente la autofluorescencia del tejido.

Pero aún se veían precipitados, al hacer la Hibridación *in situ* (ver figura 35).

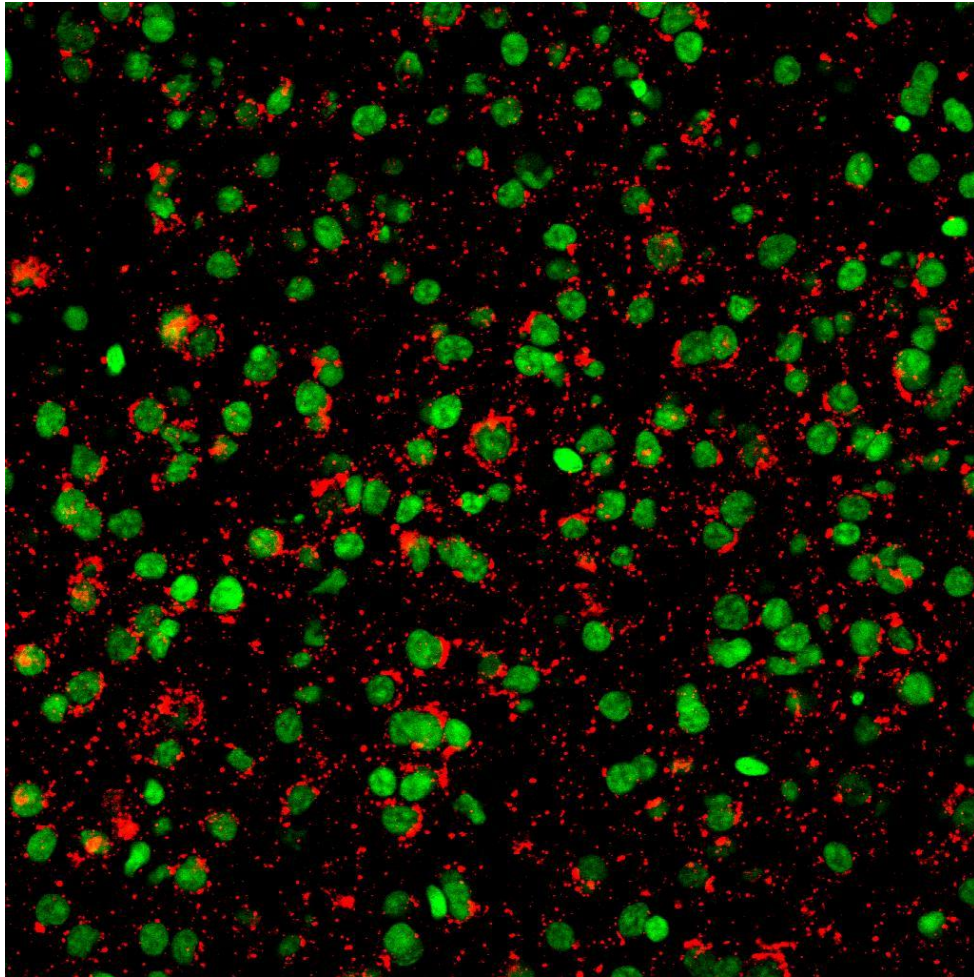


FIGURA 35. Fotografía de V1 con un objetivo 40x. En verde se observan los núcleos celulares teñidos con Sytox Green y en rojo la tinción con Cy3 de la sonda antisentido de Arc Full mono.

Para disminuir el ruido de fondo e incrementar la señal se hicieron curvas de concentración del buffer de hibridación al 15%, 30%, 50% y 60% con formamida obteniendo mejor resultado al 30% (ver figura 31).

Así mismo también se hicieron titulaciones de sonda, siendo el ideal 1ng/ul por laminilla se probaron 0.5, 1, 2, 4, 6 y 8 ng/ul. La mejor señal obtenida fue con 6 nr/ul (ver figura 36).

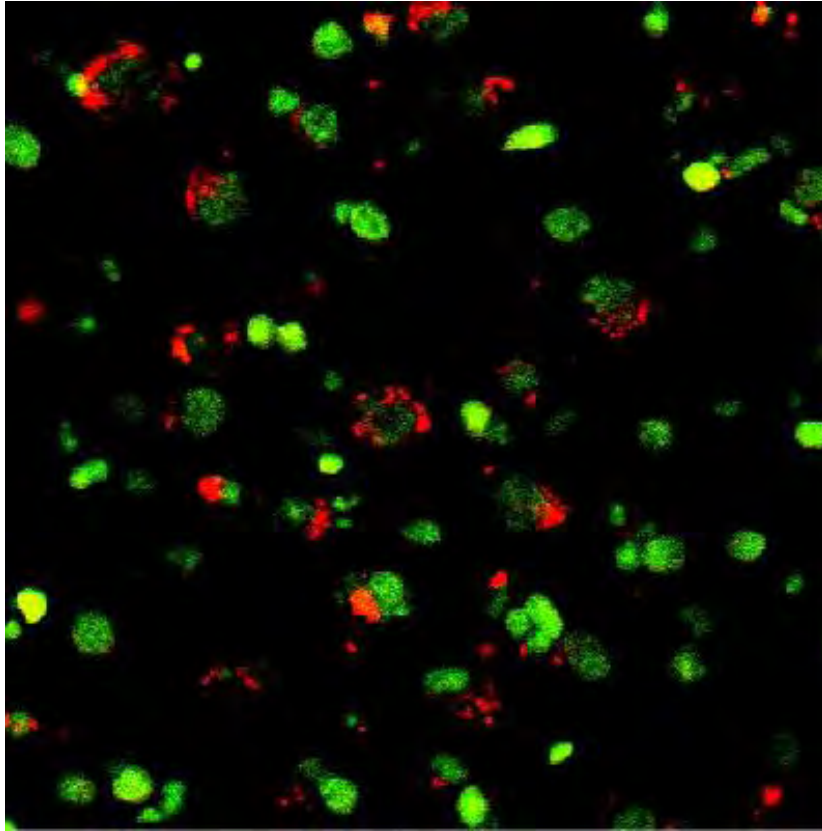


FIGURA 36. Fotografía tomada con un objetivo 40x para ver en detalle la *in situ*. En verde se observan los núcleos celulares teñidos con Sytox Green y en rojo la tinción con Cy3 de la sonda antisentido de Arc Full mono.

c) Cinética compartamental de Arc en mono

Se hizo una colaboración para caracterizar la cinética compartamental de Arc en mono así como para comprobar que la sonda era funcional para detectar Arc en primates de especies diferentes, se envió una muestra al laboratorio de Division of Neural Systems, Memory and Aging a cargo de la Dra. Carol A. Barnes en The University of Arizona, en donde realizaron cat-FISH en tejido de mono Rhesus (*Macaca Mulatta*) con nuestra sonda bajo un paradigma de estimulación de choques electro convulsivos masivamente, se sacrificó al animal a los 5 minutos para caracterizar la activación nuclear de Arc (ver figura 37). Se comprobó que la sonda funcionaba bien, pues obtuvieron señal en el tejido de mono Reshus.

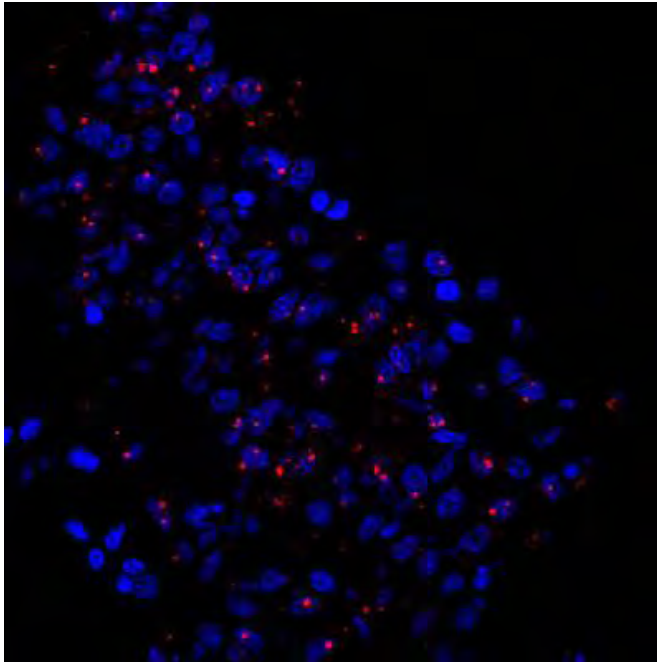


FIGURA 37. MECS nuclear (5 minutos). En azul se muestran los núcleos celulares teñidos con Dapi y en rojo la sonda antisentido de Arc Full mono, detectando activación celular tras estimulación 5

Estos resultados al unirlos con los nuestros datos del sujeto estimulado bajo la condición MECS (ver figura 38), completa todos los controles necesarios para poder caracterizar catFISH en tejido de mono, lo cual era nuestro primer propósito e hipótesis.

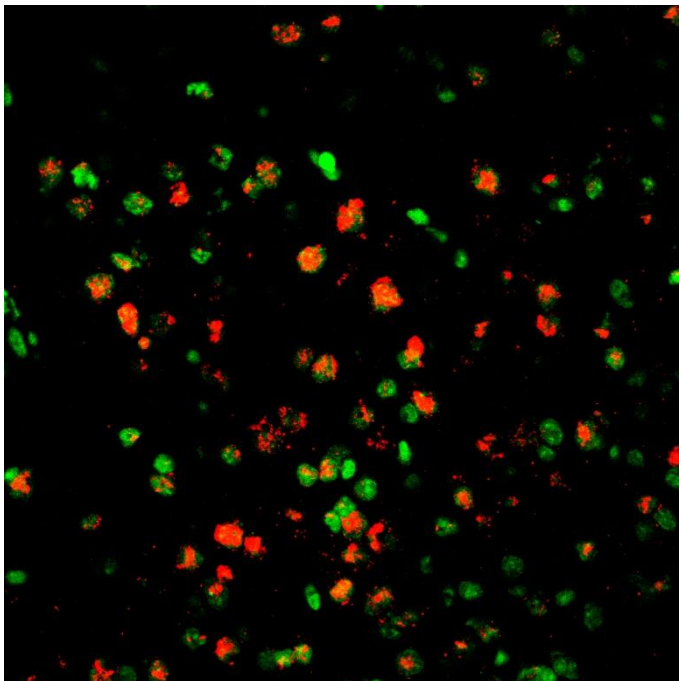


FIGURA 38. Fotografía de tejido cortical del mono estimulado con electrochoques y sacrificado 30 minutos después, se observa Arc citoplasmático en rojo y en verde los núcleos celulares..

A cada zona dibujada se le midió el número de píxeles por milímetro cuadrado que contenían y los resultados que encontramos fueron, para la Fovea 26385 pmm², V1 18869 pmm², V2 15993 pmm², V3 14379 pmm², V4 22864 pmm² y V5 11157 pmm² (ver figura 42).

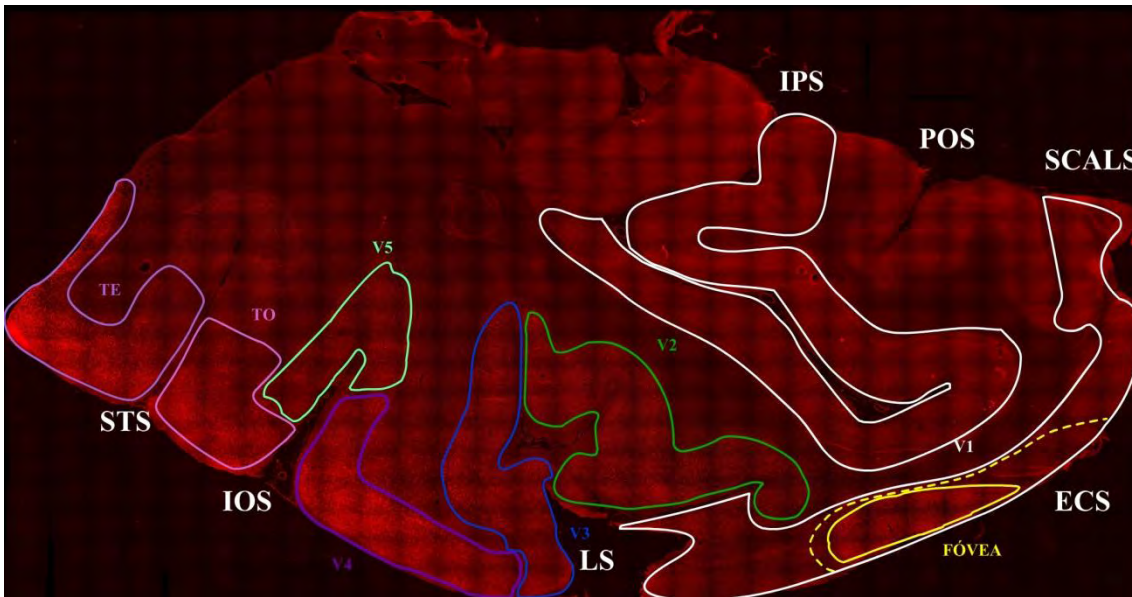


FIGURA 40. Fotografía panorámica de la corteza visual de mono resultado de cat-FISH. Se observan zonas de mayor actividad (fóvea, V4) y de menor activación (V5). Reconstruida a partir de 500 tomas individuales a 10x.

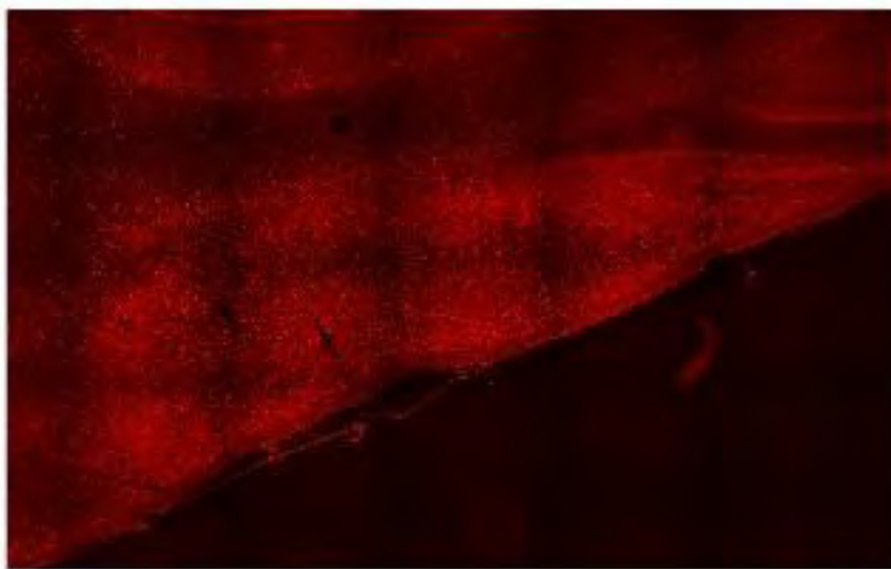


FIGURA 41. Fotografía detalle. Se muestra un zoom de V1 en la zona correspondiente a la representación de la fóvea, siendo el lugar con mayor

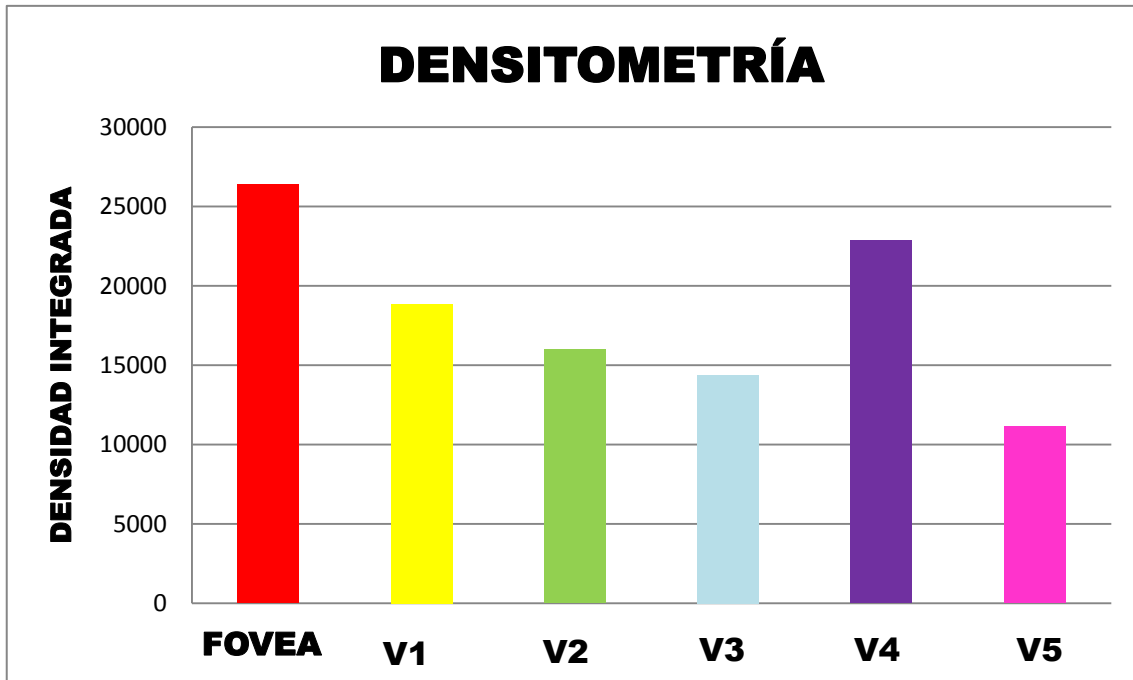


FIGURA 42. Análisis Densitométrico. Gráfica obtenida del análisis de parcelación por área cortical (FIGURA 30). La densidad integrada es el número de píxeles por área.

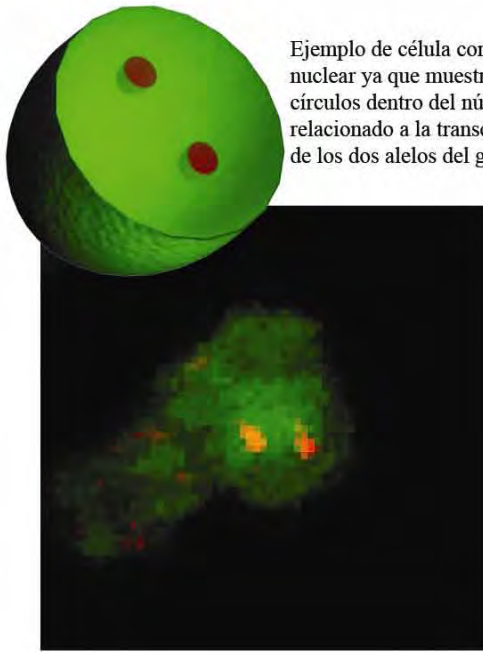
e) **Conteo Celular**

Se tomaron dos fotografías de V1, V4 y V5 respectivamente de cada laminilla y se tomaron dos series de tres laminillas seriales respectivamente.

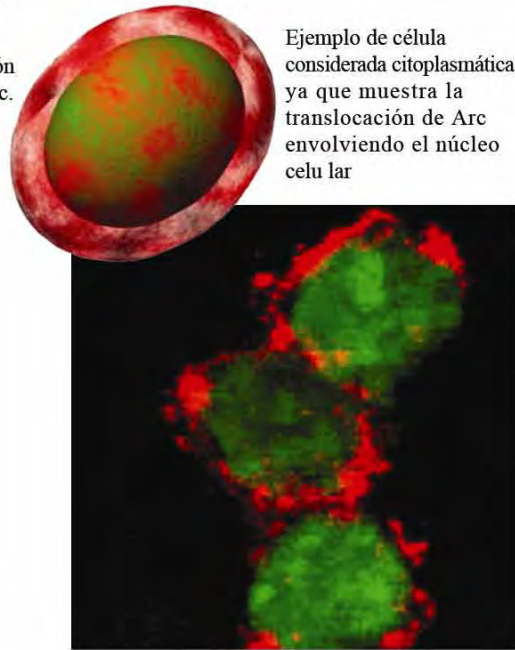
Primero se hace la distinción entre neuronas y glia, luego se toma el plano medio en el eje z y se toman las neuronas con tinción +/- tres planos para asegurar que aparezca completas.

La señal de Arc se clasifica como nuclear, citoplasmática y doble, así como las neuronas sin señal denominadas negativas (ver figura 43).

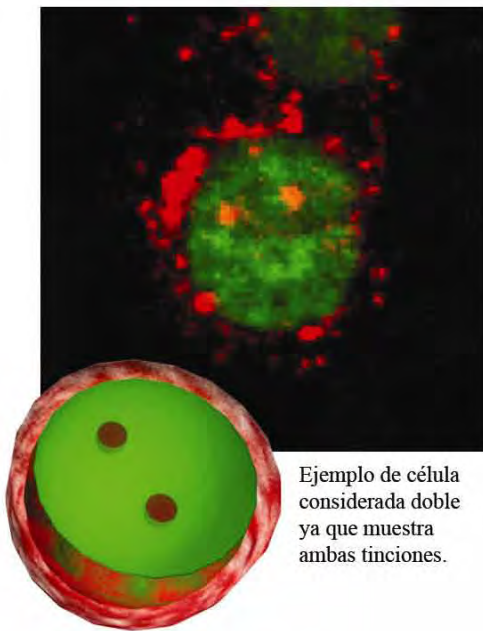
Se consideraron ~ 300 células por foto en V1 y ~ 200 células por foto en V4 y V5 respectivamente. Los resultados del conteo total se presenta en porcentajes (ver TABLA 2 y figura 44). Encontramos que V1 se activa mayoritariamente ante los dos estímulos, V4 se activa principalmente ante el estímulo del objeto y V5 presenta mayor actividad ante el estímulo del dónde.



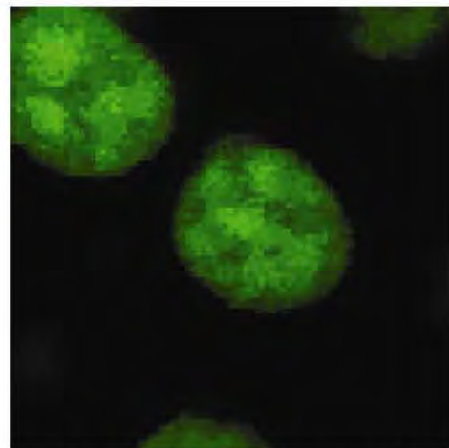
Ejemplo de célula considerada nuclear ya que muestra dos círculos dentro del núcleo, relacionado a la transcripción de los dos alelos del gen Arc.



Ejemplo de célula considerada citoplasmática ya que muestra la translocación de Arc envolviendo el núcleo celular



Ejemplo de célula considerada doble ya que muestra ambas tinciones.



Ejemplo de célula considerada negativa ya que no muestra ninguna señal de Arc.

FIGURA 43. Ejemplos de la clasificación celular. Las caricaturas ejemplifican la tridimensionalidad de las fotos reales. En rojo se muestra la expresión de Arc y en verde los núcleos celulares.

| ZONA | FOCI | CYTO | DOBL | NEG |
|------|------------|------------|------------|------------|
| V1 | 5.9243006 | 12.0680197 | 42.2929238 | 39.7696105 |
| V4 | 4.9512987 | 48.0519481 | 6.33116883 | 40.5844156 |
| V5 | 36.0675513 | 0.96501809 | 2.29191797 | 60.7961399 |

TABLA 2. Resultados en porcentaje del conteo celular.

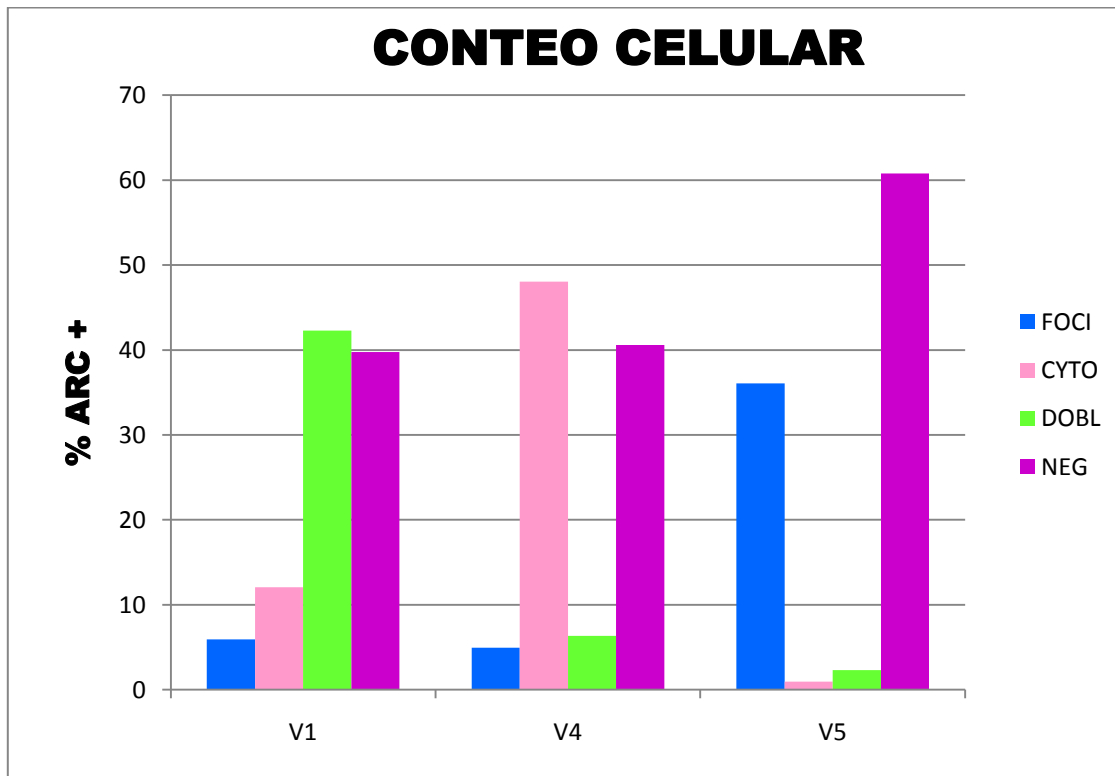


FIGURA 44. Gráfica del porcentaje total de células con tinción de Arc. Cada barra representa la compartimentalización de Arc en la célula: Foci= Células con Arc nuclear; Cyto= Células con Arc citoplasmático; Dobl= Células con nuclear y citoplasmático, Neg= Células que no presentaron expresión de Arc.

DISCUSIÓN

La inducción de expresión de ARN de Arc en las neuronas de la corteza visual primaria de mono confirmó nuestras predicciones derivadas de estudios previos en rata: nuestras dos primeras hipótesis fueron confirmadas; la expresión temporal compartamental del ARN de Arc sigue el mismo curso, se observa en el núcleo a los ~ 5 minutos, para subsecuentemente ser translocado al citoplasma a los ~ 20 minutos y segunda, la expresión del RNA de Arc fue inducida en subconjuntos celulares corticales denotando clara respuesta diferencial como resultado de las propiedades selectivas y preferentes. Estos hallazgos brindan gran apoyo a la conclusión de que la expresión del gen Arc en la corteza está ligada a patrones de actividad neuronales específicos de inputs, ahora que logramos estandarizar la técnica de cat-FISH, tenemos marcaje puntual que asegura resolución celular de mapas de actividad, esto representa una herramienta poderosa para análisis anatomofuncionales precisos.

Los cambios neuronales que ocurren en plasticidad guiada por actividad ocurren debido a patrones específicos de expresión de genes (Kaczmarek, 1993; Wallace et al., 1995). El descubrimiento de que la actividad neural puede inducir la expresión de un gran número de genes ha volteado la atención hacia los llamados GEIs y su rol en la regulación de cambios a largo plazo en la función cerebral. zif268 y c-fos han demostrado estar regulados por información visual en neuronas corticales (Worley et al., 1991; Beaver et al., 1993), sin embargo, hasta ahora todos los trabajos han estado enfocados a la caracterización de columnas de dominancia ocular.

Chaudhuri et al. (1997), utilizaron un mono verde adulto al cual le aplicaron un estímulo visual por al menos 2 hr seguido inmediatamente por uno distinto durante 30min para producir acumulación de proteína de zif268 en neuronas que prefieren el primer estímulo y mRNA de zif268 en las que prefieren el segundo. Aunque el producto de mRNA se hubiera acumulado en el primer grupo de neuronas, habría sido regulado a la baja durante los 30 min finales, a menos que estas neuronas fueran responsivas, también, al

segundo estímulo. Éstas últimas aparecerían doblemente marcadas. Hubo dos grupos de protocolo de estimulación: MD- Deprivación monocular (parche adherido con velcro) constaba de 3 hr de exposición monocular. RO- Oclusión inversa. Consistía en 3 hr de exposición en un ojo, luego cambiaron de lado el parche para 30min de exposición al otro. Se procesaron secciones coronales y tangenciales del área V1 para inmunohistoquímica ICC (proteína, 2h) e hibridación in situ ISH (RNA, 30min).

Los resultados de Chaudhuri et al. (1997) mostraron que las columnas son especialmente impresionantes en las capas supragranulares y capa IVC en todos los casos. Las delineaciones sobrepuestas de las OCDs en ICC e ISH revelan la relación espacial de las columnas definidas por mRNA y proteína. Como se esperaba, la condición MD mostró un solapamiento sustancial de ambos grupos de columnas debido a que las neuronas activadas por el ojo abierto durante el período de 3 hr habrían acumulado tanto RNA y proteína. Sin embargo, si las tasas de regulación a la alta y a la baja se ajustan para una estrategia de doble marcado, entonces se esperaría un grupo de columnas complementarias en la condición RO. Las columnas enriquecidas en proteína de zif268 se hallaban claramente separadas de aquellas que revelaron altos niveles de RNA. La ICC y la ISH revelaron grupos distintos de columnas tras la visión RO. Las células con una sola tinción son activadas monocularmente, mientras que las células con doble tinción representan las que tienen input significativamente binocular.

Con respecto a c-fos, Kaczmarek et al. (1999) se preguntaron ¿en qué momento las neuronas dentro de columnas ya existentes pueden responder de manera activa a los cambios en el entorno visual? Logrando demostrar que las neuronas dentro de la corteza tienen la maquinaria molecular en posición, desde el nacimiento, para empatar inputs sensoriales con respuestas genómicas activas. La importancia de esto es que si los productos de IEGs participan en plasticidad del desarrollo guiada por experiencia, entonces existe un requerimiento necesario para su modulación temprana en respuesta a condiciones sensoriales cambiantes.

Utilizando inmunohistoquímica, Kaczmarek et al. (1999) observaron una tira delgada de c-fos en la frontera entre las capas IVC y V, que se aprecia sólo en infantes. Se

ha demostrado que recibe proyecciones talamocorticales. Puede ser un sitio donde existe competencia dependiente de actividad, por territorio cortical entre aferentes geniculocorticales y donde deben ser evidentes las consecuencias anatómicas tras alteraciones en input sensorial. Los autores ofrecieron tres explicaciones para tales resultados:

- Las columnas pueden no estar completamente desarrolladas en esta tira tan temprano. Se puede deber a un enredo de inputs oculares en competencia guiada por actividad.
- La tira puede estar guiada por olas de actividad retinal espontánea que puede retener segregación ocular.
- La expresión de c-fos en esta tira no sea guiada por la retina sino en consecuencia de un régimen del desarrollo cortical independiente al input visual.

La caracterización de expresión de c-fos en desarrollo mostró que las intensidades de tinción a lo largo de los estratos mayores es similar en adultos e infantes. Se encontró que la corteza visual de monos infantes es capaz de evocar respuestas genómicas tan joven como el primer día postnatal y que tales respuestas dentro de columnas se mantienen durante el desarrollo postnatal. Así que el hecho de que nosotros no encontráramos columnas de dominancia ocular, no se puede atribuir al desarrollo.

La tasa de inversión de transcripción de genes es notablemente rápida. Su acumulación tiene un pico aproximadamente a los 30 minutos tras actividad y vuelve a nivel base 30 minutos tras el fin de la actividad. Previamente Horton y Hocking (1998) y Horton et al. (2000) reportaron que la inmunoreactividad de zif es ocasionalmente más alta en las columnas relacionadas al ojo enucleado que en las columnas responsivas al ojo intacto, mientras que el patrón opuesto ocurre en otros casos de enucleación monocular.

Los datos más recientes publicados en esta área son los de Takahata et al. (2009) quienes también observaron esta paradójica inversión en los patrones esperados en 2 de 6 casos de períodos largos de inactivación monocular (MI) por inyección de TTX o deprivación monocular (MD). Sin embargo, los incrementos inesperados en la expresión fueron limitados en la capa 4c, y otras capas en las columnas relacionadas al ojo inactivo

tenían menos marcaje del mensajero de zif que las capas en las columnas relacionadas con el ojo normal, revelado por una disminución en expresión de ARNm de *occl1*, *5ht1b* y *5HT2A*, así como en actividad de CO.

La evidencia de que las regiones mancha en las columnas privadas tienen niveles más elevados de actividad inicial tras MI va en contra a otra evidencia de que las manchas son centros altamente monoculares dentro de las columnas. Sea cual sea el caso, una vez que la actividad retinal de un ojo se detiene completamente, el equilibrio de interacciones binoculares en V1 se interrumpe, ocasionando incrementos o caídas rápidas de actividad neuronal en las porciones binoculares. Los cambios tardíos y más lentos pueden estar asociados a adaptaciones para visión monocular, acompañados por una depresión o potenciación a largo plazo de neuronas y posiblemente por un remodelado dependiente de actividad de los circuitos neuronales tras MI. Debe notarse que los efectos de MI en la expresión de genes en V1 no fueron causados por efecto de la TTX a parte del bloqueo de actividad. Esto debido a que los cambios en la expresión genética en la corteza ocurrieron dentro de 1h cuando no es posible transportar TTX desde el ojo inyectado hasta V1 (Takahata et al. 2009).

El patrón de cambio de actividad en V1 tras MD mediante sutura fue similar al producido MI en las capas 2/3 y 5/6. Sin embargo, a diferencia de MI, la expresión persistente de GEIs se observó en la porción privada de la capa 4C en los casos MD. Este resultado es consistente con el patrón de tinción de CO y con las propiedades fisiológicas de V1. La actividad de CO difícilmente se disminuye en la capa 4C tras varios meses de sutura de párpado, mientras que hay un evidente decremento en actividad de CO en las capas 2/3. Tras la sutura, la actividad espontánea permanece alta en células retinales, mientras que es suprimida casi completamente con TTX. La actividad retinal preservada tras la sutura probablemente se releva a la capa 4C de V1, en donde se mantiene suficiente actividad neuronal para prevenir una pérdida significativa de expresión de mRNA de GEIs. Debido a que las neuronas en las capas 2/3 integra información visual desde la capa 4C para procesar información sobre límites, iluminación, color y movimiento, la sutura de párpado abole esta significativa información visual y disminuye la actividad neuronal de las neuronas en las capas 2/3. Tales diferencias laminares en la actividad neuronal tras sutura

de párpado puede explicar por qué las neuronas en las capas extragranulares preceden a las neuronas en la capa 4 en plasticidad de dominancia ocular en animales jóvenes tras sutura y por qué las neuronas de las capas 2/3 y las de la capa 4 tienen mecanismos aparentemente paralelos de plasticidad de dominancia ocular.

Takahata propone un modelo esquemático de la arquitectura de V1 donde los cambios en la expresión de GEI que muestra la distribución de somas de neuronas activas tras MI por TTX o MD mediante sutura. En MI, la expresión disminuye en las regiones entre BLOS B en ambas columnas, especialmente en las privadas, e incrementa en las franjas frontera en las no-privadas. Tras un período, la expresión de genes eventualmente se nivela en cada columna. Este patrón secuencial es similar en MD mediante sutura, con la excepción de que la expresión de GEI casi no cambia en la capa 4C; esto podría explicar por qué nosotros no logramos observar columnas de dominancia ocular aunado al hecho que describió Guzowski et al. (2006) en el que ocurre un desacoplamiento de la actividad electrofisiológica neuronal con respecto a la tasa transcripcional génica.

El objetivo del estudio de Guzowski et al. (2006) fue determinar si el acoplamiento entre actividad neuronal y transcripción de Arc es estático o plástico. Se aproximaron a esta cuestión introduciendo ratas al mismo entorno repetidas veces a lo largo de varios días o de manera repetida durante un mismo día y determinando el efecto en la transcripción de Arc y en la actividad en neuronas de CA1, utilizando FISH y registros celulares paralelos respectivamente. Hallaron que aunque la relación entre exploración conductual y la actividad neural en CA1 permanece constante, la relación entre comportamiento y transcripción de Arc es altamente plástica para sesiones repetidas dadas el mismo día. Estos resultados indican que el acoplamiento entre actividad neural y transcripción de Arc es plástico y dependiente de historia de comportamiento, e identifican una forma de metaplasticidad que podría tener impacto en procesos de consolidación de memoria.

¿Qué relevancia tiene la plasticidad del acoplamiento electro transcripcional (ETC) en cuanto al aprendizaje y la memoria? De manera interesante, la retención de memorias espaciales y contextuales en ratas se facilita haciendo sesiones de entrenamiento a lo largo de múltiples días en comparación a la administración de la misma cantidad de sesiones en

un solo día, en intervalos similares a los usados aquí. Los hallazgos presentes sugieren una posible base molecular para esta diferencia: el entrenamiento “en masa” degrada la fidelidad del acoplamiento entre actividad neuronal y expresión de GEI, la cual es requerida para consolidación de memoria. De manera alternativa, la modificación del ETC mediante activación repetida de una neurona puede incrementar la capacidad para, y reducir la interferencia entre, la codificación de eventos distintos múltiples.

En las ratas expuestas de manera secuencial a dos entornos distintos se observó un patrón más heterogéneo de Arc, con proporciones similares de células que contienen tinción citoplasmática o nuclear, y una proporción más pequeña de células con marcaje doble. Cuatro exposiciones a contexto, separadas por 25 min son suficientes para inhibir activación transcripcional de Arc. Sin embargo, las propiedades de disparo de neuronas CA1 no cambian con exposiciones repetidas a un contexto ambiental en un día. En nuestro caso esto tendría implicación en el hecho de que aproximadamente el 80% de la información del campo visual es recibida contralateralmente en V1 y que el 20% ipsilateral por el poco tiempo de estimulación y el poco tiempo entre estimulaciones, no fuera suficiente para alcanzar a mostrar diferencias en la acumulación de la expresión de Arc, no dejando vislumbrar las columnas de dominancia ocular.

Partiendo de la hipótesis de que puede ser posible visualizar de manera separada con GEIs las neuronas que son activadas por dos condiciones de exposición visual, el interés principal del presente trabajo fue analizar la segregación funcional de las vías de procesamiento visual y logramos confirmar nuestras tres últimas hipótesis. La corteza visual del mono se asemeja a la del humano en varias formas; de aquí la importancia de generar un mapa de la distribución de las distintas áreas corticales y el análisis de sus relaciones jerárquicas.

La noción del procesamiento jerárquico fue propuesta desde los 60's por Hubel y Weisel a partir de la noción de un sistema seriado donde células simples anteceden a células complejas para después seguir a células hipercomplejas, sin embargo estudios recientes sugieren que la conexión son canales paralelos con conexiones recíprocas sin dejar de ser jerárquico, ya que hay niveles bien definidos (Felleman y Van Essen, 1991).

Este tipo de análisis se enfoca en la naturaleza de cadenas de procesamiento concurrentes en la corteza visual. Estas cadenas están ligadas del lado “input” a las capas M (magnocelular) y P (parvocelular) del LGN (núcleo geniculado lateral); y del lado “output” a regiones funcionalmente distintas de los lóbulos parietal y temporal.

Es un hecho que existe una considerable segregación de flujo informático a través de la ruta visual; por otro lado, también hay un entrecruzamiento considerable entre cadenas en etapas sucesivas del procesamiento. Es posible que estas complejidades en los circuitos anatómicos reflejen la multiplicidad de las estrategias computacionales que son necesarias para el funcionamiento visual eficiente.

Existen 32 áreas neocorticales implicadas en el procesamiento visual las cuales se basan en la ocurrencia de neuronas visualmente responsivas o la presencia de inputs provenientes de áreas visuales conocidas (Felleman y Van Essen, 1991).

La extensión general de la corteza visual corresponde a las regiones identificadas en el estudio por 2-desoxiglucosa (Macko y Mishkin, 1985); aunque no todas estas áreas son exclusivamente visuales en función. Las contribuciones no visuales incluyen inputs de otras modalidades sensoriales (auditivas y somatosensoriales), actividad visuomotora e influencias atencionales o influencias cognitivas.

Se han trazado 25 áreas que aparentan ser predominantemente o exclusivamente visuales y otras 7 áreas neocorticales que están menos ligadas a la visión y que se consideran como áreas de asociación visual.

- 9 áreas visuales en el lóbulo occipital
- 10 áreas visuales (una es de asociación) en el lóbulo parietal
- 11 áreas visuales en el lóbulo temporal
- 2 áreas de asociación visual en el lóbulo frontal

Estas demarcaciones de límites entre áreas involucra varios tipos de análisis por ejemplo;

- *Análisis de conectividad*- Encontrar patrón característico de inputs-outputs dentro de cada área cortical.
- *Arquitectónicos*- Técnicas de tinción como la mielina (Nissl).
- *Organización Topográfica*- Mapeo ordenado del campo visual dentro de cada área, según su anatomía o fisiología. Aproximadamente ½ de las áreas visuales identificadas muestran organización topográfica.

Además de estos acercamientos metodológicos, se ha facilitado la identificación de algunas áreas utilizando información sobre características fisiológicas proveniente de propiedades de campo de neuronas y por medio de exámenes en las consecuencias de comportamiento en lesiones restringidas o estimulación eléctrica focal.

Idealmente, cada área debería ser identificable independientemente utilizando todos los enfoques previamente mencionados. Sin embargo, en la mayoría se utilizaron solamente uno o dos (Van Essen, 1985). Por tanto, para nosotros representó un gran reto poder hacer la parcelación de áreas en el análisis densitométrico y los límites fueron determinados por la misma tinción diferencial, así proponemos que es necesaria una correlación electrofisiológica para determinar la magnitud de las respuestas a estímulos preferenciales, así como la selectividad o especificidad de la tasa de disparo.

Por lo que respecta a la reciprocidad y conectividad distribuida de conexiones corticocorticales entre las distintas áreas proponemos un análisis complementario de técnicas histológicas como Nissl, GAD 68 o marcadores retrogrados y anterogrados para poder discutir en términos de la evidencia que existe desde hace más de dos décadas, que las rutas tienden a ser bidireccionales, es decir, existen proyecciones de esta forma: $A \rightarrow B$, $B \rightarrow A$ (Tigges et al., 1973; Rockland y Pandya, 1979).

Al parecer la reciprocidad puede variar entre individuos en algunos casos, o de una zona a otra. Sin embargo, también hay que considerar que dependiendo de la sustancia utilizada para el rastreo y los distintos protocolos de inyección pueden variar en su sensibilidad y revelar proyecciones débiles o difusas; por ejemplo, la ruta $V1 \rightarrow V5$ aparece débil o dispersa en Van Essen (1985) y los datos que obtuvimos (ver figura 37)

apoyan este hecho al observar que la densidad relativa (número de píxeles por área) en V5 es la menor (11157 pp²) en comparación con todas las áreas analizadas, así también, se explica el hecho observado en la figura 39 donde se observa que V5 tiene el mayor porcentaje de neuronas arc negativas con respecto a las demás áreas. Sin embargo, Colby et al. (1988) al utilizar inyecciones mayores de un rastreador más sensible muestra una conexión más robusta. Quizá nuestros resultados sólo se pueden explicar en términos de una inadecuada estimulación, ya que durante la segunda estimulación, el sujeto sufrió un paro respiratorio y a pesar de que se logró recuperar rápidamente, la calidad de la estimulación no fue de la misma magnitud que la primera.

Recapitulando, las ideas actuales sobre la organización jerárquica en el sistema visual de primates nacieron por nociones de rutas de feedforward y feedback sugeridas por patrones de conectividad; en particular Rockland y Pandya (1979) notaron que las proyecciones en una dirección tienden a originarse en capas superficiales y terminar en la capa 4, mientras que en dirección opuesta, surgen desde las capas superficiales y terminan fuera de la capa 4.

Considerando que la información laminar se ha triplicado en los últimos años, es necesario cotejar si los mismos principios de organización permitirán incorporar todas las áreas y rutas corticales a una sola jerarquía consistente; para identificar relaciones jerárquicas hay que incluir todos los tipos de patrones laminares de inputs-outputs identificados a la fecha. Los patrones distintos están arreglados para mostrar las distribuciones laminares de células de origen y terminaciones axonales que se consideran indicadores de rutas ascendientes, laterales y descendientes.

En general, los resultados en este rubro muestran una segregación funcional de la vía visual, los procesos de color, forma y espaciotemporales son relativamente independientes por ejemplo, en las rutas ascendentes (originando en V1 y pasando a través de las capas 4 3 de V2) pero se reintegran en las capas superficiales y profundas donde son sujetas a la influencia de feedback proveniente de centros superiores. Una comparación previa de V1 y V2 concluyó que la selectividad dual para color y dirección es más frecuente en V2 (Tamura et al., 1996). Otros estudios en V2 han encontrado selectividad

dual para color/orientación y color/dirección, pero no existe un acuerdo en cuanto a si estas propiedades se asocian de manera aleatoria (Burkhalter y Van Essen, 1986; Gegenfurtner et al., 1996; Friedman et al., 2003).

Las frecuencias de selectividad para color, dirección y orientación en la corteza visual pueden variar ampliamente entre estudios, lo cual no permite un raciocinio simple que dependiente del uso de animales alertas o anestesiados y de la captura de datos cualitativa vs cuantitativa.

Tanto en V1 como V2, la capa 2 es una fuente mínima de output ascendente en comparación a la capa 3. Su rol esencial por lo tanto puede ser la participación en funciones intrínsecas/integrativas y de feedback. En V1, los campos receptivos de las neuronas de la capa 2 se han reportado de mayor tamaño, pero con una afinación menos precisa que las de la capa 3 y que muestran mayor actividad espontánea (Gur y Snodderly, 2008). Estas propiedades parecen ser consistentes con un circuito modulador, en contraste con la capa 3 que parece especializarse en transmitir características focales específicas de la imagen.

Una diferencia clave entre las neuronas piramidales en la capa 2 y las de la 3 es que las primeras tienen dendritas apicales con ramas colaterales muy espinosas que se arborizan extensivamente en la capa 1 (Lund et al., 1981; Peters et al., 1997). Las neuronas piramidales de la capa 3 pueden ser de mayor tamaño, pero sus dendritas apicales son menos profundas; si el tallo apical principal se eleva hasta la capa 1, lleva pocas espinas y se arboriza de manera muy dispersa (Lund et al., 1981). La capa uno es el blanco principal de feedback proveniente de áreas elevadas con especialización funcional tales como V4 y V5. Los axones de feedback de V4 a V2 se han estudiado recientemente (Anderson y Martin, 2006). Tras extender algunas colaterales en la capa 6, se elevan hasta la capa 1 donde sus ramificaciones viajan varios milímetros. Las sinapsis, examinadas por microscopía electrónica, son todas asimétricas (excitatorias) y el 80% tienen contacto con las espinas de dendritas de neuronas piramidales. Tal circuito, que surge y termina en células piramidales glutamatergicas, probablemente genera un feedback modulador positivo.

Shipp et al. (2009) analizaron las zonas de capas compartimentalizandolas como ascendientes 3 y 4 vs feedback 1,2,5 y 6. Sus datos no mostraron una diferencia tajante en la proporción de células duales: 18% vs 25% para color/eje y 3% vs 11% para color/dirección. No existe una demarcación laminar abrupta entre la influencia de conexiones ascendentes y descendientes, especialmente en la transición de la base de la capa 3 a la capa superficial 1. Afirmaron que la terminación difusa de árboles axonales, aunada a los campos dendríticos translaminares, dicta que solamente podemos tener una muestra rudimentaria de las influencias fisiológicas de inputs con orígenes anatómicos distintos.

Para aclarar, no infieren que los inputs de feedback directamente generen afinación dual. Es posible que algunos elementos del feedback sean severamente atenuados por la anestesia por ejemplo, los registros de implantes de electrodo en V1 bajo condiciones alerta y anestesiada sugiere que la anestesia elimina respuestas contextuales que probablemente dependen de feedback (Lamme et al., 1998). En contraste, las propiedades básicas de afinación tales como la selectividad a orientación se conservan en estado anestesiado.

Las neuronas bimodales pueden jugar un papel de “puenteo” a nivel local, dispersando un sesgo atencional “arriba-abajo” del rasgo diana a la representación de otras características con las cuales el rasgo diana tiene conjunción espaciotemporal. En v2 esto requeriría actividad mejorada por feedback para propagarse de neuronas bimodales en la capa 2 a neuronas de output similarmente selectivas (pero unimodales) en la capa 3 con campos receptivos que se sobrelapen. El mecanismo de puenteo se vuelve un mecanismo de conjunción perceptual en el contexto de la teoría de “competencia integrada” de la atención, ya que promueve la consistencia de selección de objeto entre áreas elevadas de la corteza con diferentes especializaciones. La propuesta de puenteo permitiría que un sesgo de movimiento específico a color se inyectara en una ruta que careciera de cualquier selectividad de color intrínseca (Shipp et al., 2009).

Las neuronas en las rutas ascendentes (laminas 3 y 4) son funcionalmente especializadas (o sea relativamente restringidas en su dimensionalidad de rasgos). Existen combinaciones de rasgos más amplias que se conectan en las capas internas y externas,

generando neuronas multimodales en ubicaciones laminares, que están sujetas a sesgo por feedback, incluyendo efectos específicos de características. Este efecto modulador de la actividad se transmite a través de conexiones intrínsecas de manera que la combinación de características seleccionada se refleja en el patrón de actividad a través de neuronas unimodales de output. Así, las células superficiales y profundas pueden ser consideradas neuronas “puente” que actúan transfiriendo sesgos atencionales entre las dimensiones de rasgos. Esto evidentemente constituiría un mecanismo de conjunción que promueve un resultado unificado entre los procesos competitivos de objeto en áreas corticales separadas, generando sesgo de selección entre todas las características del objeto diana, como lo concibe el modelo de competencia integrada.

CONCLUSIONES

A pesar de que nuestros datos son sumamente descriptivos y de naturaleza cualitativa, es un hecho que la técnica de cat-FISH es una herramienta poderosa y adecuada para caracterizar actividad neuronal diferencial dependiente de dos eventos perceptuales, lo cual deriva de nuestra hipótesis 1, quién fue corroborada.

También confirmamos nuestra hipótesis 2, en la cual esperábamos encontrar la misma expresión temporal compartamental de Arc en primate que en rata, lo cual le confiere características altamente conservadas entre especies y se podría correlacionar con su importancia en aprendizaje y memoria.

Se concluye que la corteza visual es un sistema de proceso de información altamente distribuido, ya que logramos observar diferencias cualitativas con el análisis densitométrico y diferencias cuantitativas con el conteo celular por zonas. Pudimos aceptar nuestra hipótesis 3, ya que la zona donde se encontró mayor coactivación neuronal (Arc en núcleo y citoplasma juntos) fue en V1, así como nuestras hipótesis 4 y 5, donde enunciábamos la expresión diferencial ante neuronas respondientes al *qué* y al *dónde*, respectivamente.

Es necesario hacer un análisis más amplio para poder hacer comparaciones más puntuales a nivel laminar, así como entre áreas. Sólo así se podrá determinar la independencia o autonomía de cada ensamble neuronal implicado en cada vía funcional, es decir, la vía ventral del *qué* y la vía dorsal del *dónde*.

REFERENCIAS

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter, P. 2002. *Molecular Biology of the Cell* 4th edition. Garland Science, Taylor Group.
- Anderson JC, Martin KAC. 2006. *Synaptic connection from cortical area V4 to V2 in macaque monkey*. J Comp Neurol. 495:709-721.
- Ango F, Robbe D, Tu JC, Xiao B, Worley PF, Pin JP, Bockaert J, Fagni L. 2002. *Homer-dependent cell surface expression of metabotropic glutamate receptor type 5 in neurons*. Mol Cell Neurosci. 20; 2:323-329.
- Baizer JS, Ungerleider LG, Desimone R. 1991. *Organization of visual inputs to the inferior temporal and posterior parietal cortex in macaques*. J Neurosci. 11; 1:168-190.
- Baker CL, Hess RF, Zihl J. 1991. *Residual motion perception in a motion blind patient, assessed with limited life timerandom dot stimuli*. J. Neurosci. 11:454-461.
- Beaver CJ, Mitchell DE, Robertson HA. 1993. *Immunohistochemical study of the pattern of rapid expression of c-fos protein in the visual cortex of dark-reared kittens following initial exposure to light*. J Comp Neurol. 333:469-484.
- Bellefeuille A, Faubert J. 1998. *Independence of contour and biological motion cues for motion defined animal shapes*. Perception. 27:225-235.
- Burkhalter A, Van Essen DC. 1986. *Processing of color, form and disparity information in visual areas VP and V2 of ventral extrastriate cortex in the macaque monkey*. J Neurosci. 6:2237-2351.
- Chaudhuri A, Matsubara JA, Cynader MS. 1995. *Neuronal activity in primate visual cortex assessed by immunostaining for the transcription factor Zif268*. Vis Neurosci. Jan-Feb;12; 1:35-50.
- Chaudhuri A. 1997. *Neural activity mapping with inducible transcription factors*. NeuroReport. Sep 8:8-13. Review.
- Chaudhuri A, Nissanov J, Larocque S, Rioux L. 1997. *Dual activity maps in primate visual cortex produced by different temporal patterns of zif268 mRNA and protein expression*. Proc Natl Acad Sci U S A. Mar 94; 6:2671-2675.
- Colby CL, Gattass R, Olson CR, Gross CG. 1988. *Topographic organization of cortical afferents to extrastriate visual area PO in the macaque: a dual tracer study*. J Comp Neurol. 269:392-413.
- Courtney SM, Ungerleider LG, Keil K, Haxby JV. 1996. *Object and spatial visual working memory activate separate neural systems in human cortex*. Cereb Cortex. 6; 1:39-49.
- Cowen T, Haven AJ, Burnstock G. 1985. *Pontamine sky blue: a counterstain for background autofluorescence in fluorescence and immunofluorescence histochemistry*. Histochemistry. 82:205-208.
- DeYoe EA, Felleman DJ, Van Essen DC, McClendon E. 1994. *Multiple processing streams in occipitotemporal visual cortex*. Nature. 317:58-61.
- Dubuc B. 2002. *The brain from top to bottom*. McGill University. Quebec, Canada.

- Dürsteler MR, Wurtz RH, Newsome WT. 1987. *Directional pursuit deficit following lesions of the foveal representation within the superior temporal sulcus of the macaque monkey*. J Neurophysiol. 57:1262-1287.
- Felleman DJ and Van Essen DC. 1991. *Distributed hierarchical processing in the primate cerebral cortex*. Cereb Cortex. 1: 1-47.
- Felleman, DJ, Xiao Y, McClendon E. 1997. *Modular organization of occipito-temporal pathways: cortical connections between visual area 4 and visual area 2 and posterior inferotemporal ventral area in macaque monkeys*. J Neurosci. 17; 9:3185-3200.
- Friedman HS, Zhou H, Von der Heydt R. 2003. *The coding of uniform colour figures in monkey visual cortex*. J Physiol (Lond) 548:593-613.
- Gegenfurtner KR, Kiper DC, Fenstemaker SB. 1996. *Processing of colour, form and motion in macaque area V2*. Vis Neurosci. 13:161-172.
- Guld C, Bertulis A. 1976. *Representation of Fovea in the Striate Cortex of Vervet Monkey, Cercopithecus Aethiops Pygerythrus*. Vision Res. 16:629-31.
- Gur M, Snodderly DM. 2008. *Physiological differences between neurons in layer 2 and layer 3 of primary visual cortex (V1) of alert macaque monkeys*. J Physiol (Lond) 586:2293-2306.
- Guzowski JF, McNaughton BL, Barnes CA, Worley PF. 1999. *Environment-specific expression of the immediate-early gene Arc in hippocampal neuronal ensembles*. Nat Neurosci. 2; 12:1120-4.
- Guzowski JF, Miyashita T, Chawla MK, Sanderson J, Maes LI, Houston FP, Lipa P, McNaughton BL, Worley PF, Barnes CA. 2006. *Recent behavioral history modifies coupling between cell activity and Arc gene transcription in hippocampal CA1 neurons*. Proc Natl Acad Sci U S A. 103; 4:1077-82.
- Hubel DH. 1963. *The Visual Cortex of the Brain*. Sci Am 209:54-62.
- Hubel DH. 1979. *The visual cortex of normal and deprived monkeys*. Am Sci 67;5:532-543.
- Hubel DH. 1999. *Eye, brain and vision*. 2th ed. New York: Scientific American Library.
- Hubel DH, Wiesel TN. 1972. *Laminar and columnar distribution of geniculocortical fibers in the macaque monkey*. J Comp Neurol. 146; 4:421-50.
- Hubel DH, Wiesel TN. 1979. *Brain mechanisms of vision*. Sci Am 241; 3:150-62.
- Hubel DH, Wiesel TN, LeVay S. 1977. *Plasticity of ocular dominance columns in monkey striate cortex*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 278; 961:377-409.
- Horton JC, Hocking DR. 1998. *Monocular core zones and binocular border strips in primate striate cortex revealed by the contrasting effects of enucleation, eyelid suture, and retinal laser lesions on cytochrome oxidase activity*. J Neurosci. 18;14:5433-55.
- Horton JC, Hocking DR, Adams DL. 2000. *Rapid identification of ocular dominance columns in macaques using cytochrome oxidase, Zif268, and dark-field microscopy*. Vis Neurosci. 4; :495-508.
- Kahle W, Frotscher M. 2003 *Color atlas and textbook of human anatomy*, 5th ed. Stuttgart. Pp. 355.

- Kaczmarek L. 1993. *Molecular biology of vertebrate learning: Is c-fos a new beginning?* J Neurosci Res. 34:377-381.
- Kaczmarek L, Zangenehpour S, Chaudhuri, A. 1999. *Sensory regulation of immediate-early genes c-fos and zif268 in monkey visual cortex at birth and throughout the critical period.* Cereb Cortex. 9; 2:179-187.
- Kobatake E, Tanaka K. 1994. *Neuronal selectivities to complex object features in the ventral visual pathway of the macaque cerebral cortex.* J Neurophys. 71:856-866.
- Komatsu H, Ideura Y. 1993 *Relationships between color, shape and patterns selectivities of neurons in the inferior temporal cortex of the monkey.* J Neurophysiol. 70:677-694.
- Lamme VA, Zipser K, Spekreijse H. 1998. *Figure-ground activity in primary visual cortex is suppressed by anesthesia.* Proc Natl Acad Sci USA. 95:3263-3268.
- Livingstone, MS, Hubel D.H. 1982. *Thalamic inputs to cytochrome oxidase-rich regions in monkey visual cortex.* Proc Natl Acad Sci USA. 79; 19:6098-101.
- Logothetis NK. 1999. *Vision: A window on consciousness.* Scientific American. 281:44-51.
- Lund JS, Hendrickson AE, Ogren MP, Tobin EA. 1981. *Anatomical organization of primate visual cortex area VII.* J Comp Neurol. 202:19-45.
- Lyford GL, Yamagata K, Kaufmann WE, Barnes CA, Sanders LK, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Lanahan AA, Worley PF. 1995. *Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites.* Neuron. 14; 2:433-45.
- Macko KA, Mishkin M. 1985. *Metabolic mapping of higher-order visual areas in the monkey.* Sokoloff L (ed.), Brain imaging and brain function. pp. 73-86.
- Maunsell JH and Van Essen DC. 1983. *The connections of the middle temporal visual area (MT) and their relationship to a cortical hierarchy in the macaque monkey.* J Neurosci. 3; 12:2563-86.
- Merigan WH, Maunsell JHR. 1990. *Macaque vision after magnocellular lateral geniculate lesions.* Vis Neurosci. 11:994-1001.
- Millodot M, Lamont A. 1974. *Letter: Refraction of the periphery of the eye.* J Opt Soc Am. 64; 1:110-11.
- Mishkin M, Ungerleider LG. 1982. *Contribution of striate inputs to the visuospatial functions of parieto-preoccipital cortex in monkeys.* Behav Brain Res. 6; 1:57-77.
- Mishkin M, Ungerleider LG, Macko KA. 1983. *Object vision and spatial vision: two cortical pathways.* Trends in neurosciences. 6:414-417.
- Mosiman VL, Patterson BK, Canterero L, Goolsby CL. 1997. *Reducing cellular autofluorescence in flow cytometry: an in situ method.* Cytometry. 30:151-156.
- Movshon JA, Adelson EH, Gizzi MS Newsome WT. 1985. *The analysis of moving visual patterns in : C Chagas, R Gattass, C Gross.* Pattern Recognition Mechanisms. 117-151.
- Neumann M, Gabel. 2002. *Detlef Simple Method for Reduction of Autofluorescence in Fluorescence Microscopy.* Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 50:437-439.

- Newsome WT, Pare EB. 1988. *A selective impairment of motion perception following lesions of the middle temporal visual area (MT)*. J Neurosci. 8:2201-2211.
- Peters A, Cifuentes JM, Sethares C. 1997. *The organization of pyramidal cells in area 18 of the rhesus monkey*. Cereb Cortex. 7:405-421.
- Rockland KS, Pandya DN. 1979. *Laminar origins and terminations of cortical connections of the occipital lobe in the rhesus monkey*. Brain Res. 179; 1:3-20.
- Rockland KS, Pandya DN. 1981. *Cortical connections of the occipital lobe in the rhesus monkey: interconnections between areas 17, 18, 19 and the superior temporal sulcus*. Brain Res. 212 ;2:249-70.
- Salzman CD, Newsome WT. 1994. *Neural mechanisms for forming a perceptual decision*. Science. 264:231-237.
- Sambrook J, Russel DW. 2001. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor.
- Schiller PH, Sandell JH, Maunsell JH. 1986. *Functions of the ON and OFF channels of the visual system*. Nature. 322; 6082:824-5.
- Schnell StA, Staines WA, Wessendorf MW. 1999. *Reduction of liposfucsin-like autofluorescence in fluorescently labeled tissue*. J Histochem Cytochem. 47:719-730.
- Shipp S, Adams DL, Moutoussis K, Zeki S. 2009 *Feature binding in the feedback layers of area V2*. Cerebral Cortex. 19:2230-2239.
- Skrandies W. 1985. *Human contrast sensitivity: regional retinal differences*. Hum Neurobiol. 4; 2:97-9.
- Steward O, Worley PF. 2001(a). *Selective targeting of newly synthesized Arc mRNA to active synapses requires NMDA receptor activation*. Neuron. 30; 1:227-40.
- Steward O, Worley PF. 2001(b). *A cellular mechanism for targeting newly synthesized mRNAs to synaptic sites on dendrites*. Proc Natl Acad Sci USA. 98;13:7062-8. Review.
- Takahata T, Higo N, Kaas JH, Yamamori T. 2009. *Expression of immediate-early genes reveals functional compartments within ocular dominance columns after brief monocular inactivation*. Proc Natl Acad Sci U S A. Jul 21; 106; 29:12151-5.
- Tamura H, Sato H, Katsuyama N, Hata Y, Tsumoto T. 1996. *Less segregated processing of visual information in V2 than V1 of the monkey visual cortex*. Eur J Neurosci. 8:300-309.
- Tigges J, Spatz WB, Tigges M. 1973. *Reciprocal point-to-point connections between parastriate and striate cortex in the squirrel monkey (Saimiri)*. J Comp Neurol. 148:481.
- Tootell RB, Hadjikhani N, Hall EK, Marrett S, Vanduffel W, Vaughan JT, Dale AM. 1998. *The retinotopy of visual spatial attention*. Neuron. 6:1409-22.
- Ungerleider LG, Mishkin M. 1982. *Two cortical visual systems*. Goodale MA (ed.), Analysis of Visual Behavior. pp. 549-586.
- Van Essen DC. 1985. *Functional organization of primate visual cortex*. Cereb cortex. 3:259-329.

- Van Essen, DC, Anderson CH, Felleman DJ. 1992. *Information processing in the primate visual system: an integrated systems perspective*. Science. 255; 5043:419-23.
- Van Essen DC, Felleman DJ, DeYoe EA, Olavarria J, Knierim J. 1990. *Modular and hierarchical organization of extrastriate visual cortex in the macaque monkey*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 55:679-96.
- Van Essen DC, Newsome WT, Maunsell JH. 1984. *The visual field representation in striate cortex of the macaque monkey: asymmetries, anisotropies, and individual variability*. Vision Res. 24; 5:429-48.
- Vazdarjanova A, Guzowski JF. 2004. *Differences in hippocampal neuronal population responses to modifications of an environmental context: evidence for distinct, yet complementary, functions of CA3 and CA1 ensembles*. J Neurosci. 24; 29:6489-96.
- Vazdarjanova A, McNaughton BL, Barnes CA, Worley PF, Guzowski JF. 2002. *Experience-dependent coincident expression of the effector immediate-early genes arc and Homer 1a in hippocampal and neocortical neuronal networks*. J Neurosci. 22; 23:10067-71.
- Victoria L, Mosiman B, Patterson K, Canterero L, Goolsby CL. 1997. *Reducing Cellular Autofluorescence in Flow Cytometry: An In Situ Method*. Communications in Clinical Cytometry. 30:151-156.
- Wallace CS, Withers GS, Weiler IJ, George JM, Clayton DF, Grenough WT. 1995. *Correspondence between sites of NGFI-A induction and sites of morphological plasticity following exposure to environmental complexity*. Brain Res Mol Brain Res. 32:211-220.
- Waltereit R, Dammermann B, Wulff P, Scafidi J, Staubli U, Kauselmann G, Bundman M, Kuhl D. 2001. *Arg3.1/Arc mRNA induction by Ca²⁺ and cAMP requires protein kinase A and mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase activation*. J Neurosci. 21; 15:5484-93.
- Wang KH, Majewska A, Schummers J, Farley B, Hu C, Sur M, Tonegawa S. 2006. *In vivo two-photon imaging reveals a role of arc in enhancing orientation specificity in visual cortex*. Cell. 126; 2:389-402.
- Wiesel, TN and Hubel DH. 1974. *Ordered arrangement of orientation columns in monkeys lacking visual experience*. J Comp Neurol. 158; 3:307-18.
- Wilkie RM, Wann JP. 2005. *Judgments of path, not heading, guide locomotion*. Journal of experimental psychology. Journal of Experimental Psychology. 32;1:88-96.
- Worley PF, Christy BA, Nakabeppu Y, Bhat RV, Cole AJ, Baraban JM. 1991. *Constitutive expression of zif268 in neocortex is regulated by the synaptic activity*. Proc Natl Acad Sci USA. 88:5106-5110.
- Zeki, S. 1993. *A vision of the brain*. Oxford: Blackwell Scientific Publications
- Zeki S, Watson JD, Lueck CJ, Friston KJ, Kennard C, Frackowiak RS. 1991. *A direct demonstration of functional specialization in human visual cortex*. J. Neurosci. 11:641-649.

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

| | | |
|--|----|----|
| FIGURA 1. Sistema Visual. | Pp | 1 |
| FIGURA 2. Capas en V1. | Pp | 3 |
| FIGURA 3. Detalle de V1. | Pp | 4 |
| FIGURA 4. Corteza visual de mono. | Pp | 4 |
| FIGURA 5. Células dispuestas en capas. | Pp | 5 |
| FIGURA 6. Arquitectura de V1. | Pp | 5 |
| FIGURA 7. Células Ganglionares. | Pp | 8 |
| FIGURA 8. La vía visual. | Pp | 10 |
| FIGURA 9. Caricatura de una macrocolumna. | Pp | 11 |
| FIGURA 10. Reconstrucción de LeVay. | Pp | 12 |
| FIGURA 11. Flujo de información. | Pp | 14 |
| FIGURA 12. Jerarquía de las áreas visuales. | Pp | 15 |
| FIGURA 13. Las dos vías. | Pp | 17 |
| FIGURA 14. Principales conexiones. | Pp | 19 |
| FIGURA 15. Flujo sanguíneo detectado con PET. | Pp | 23 |
| FIGURA 16. Perfiles de tinción utilizando catFISH. | Pp | 29 |
| FIGURA 17. Caricatura de estimulación. | Pp | 35 |
| FIGURA 18. Fondo texturizado. | Pp | 36 |
| FIGURA 19. Secuencia de caballo corriendo. | Pp | 36 |
| FIGURA 20. Silueta texturizada. | Pp | 36 |
| FIGURA 21. Optic Flow. | Pp | 36 |
| FIGURA 22. Tejido montado en el cristato. | Pp | 38 |
| FIGURA 23. Mapa retinotópico. | Pp | 39 |
| FIGURA 24. Fotografía de sección horizontal de V1. | Pp | 40 |
| FIGURA 25. Mapa del plásmido donado. | Pp | 42 |
| FIGURA 26. Fotografía de gel. | Pp | 42 |
| FIGURA 27. Mapa del plásmido utilizado. | Pp | 45 |
| FIGURA 28. Fotografía de gel. | Pp | 46 |
| FIGURA 29. Fotografía de gel. | Pp | 46 |

| | | |
|--|----|----|
| TABLA 1. Concentraciones para ligación. | Pp | 47 |
| FIGURA 30. Protocolo de Transfección y Transformación. | Pp | 48 |
| FIGURA 31. Caricatura que ejemplifica la reacción azul. | Pp | 49 |
| FIGURA 32. Fotografía de gel. | Pp | 51 |
| FIGURA 33. Fotografía de V1 de mono verde con autofluorescencia. | Pp | 54 |
| FIGURA 34. Fotografía de autofluorescencia eliminada. | Pp | 54 |
| FIGURA 35. Fotografía de V1 con un objetivo 40x. | pp | 55 |
| FIGURA 36. Fotografía para ver en detalle la <i>in situ</i> . | Pp | 56 |
| FIGURA 37. MECS nuclear (5 minutos). | Pp | 57 |
| FIGURA 38. MECS citoplasmático (30 minutos). | Pp | 57 |
| FIGURA 39. Diagrama de las vías funcionales en V1. | Pp | 58 |
| FIGURA 40. Fotografía panorámica de V1. | Pp | 59 |
| FIGURA 41. Fotografía detalle. | Pp | 59 |
| FIGURA 42. Análisis Densito métrico. | Pp | 60 |
| FIGURA 43. Ejemplos de la clasificación celular. | Pp | 61 |
| TABLA 2. Resultados en porcentaje del conteo celular. | Pp | 62 |
| FIGURA 44. Gráfica del porcentaje total de células con tinción de Arc. | Pp | 62 |

Apendice I. Hibridación *in situ* fluorescente.

Las técnicas de hibridación permiten localizar secuencias específicas de ácidos nucleicos en cromosomas y células. La **hibridación *in situ* fluorescente o FISH** es una nueva tecnología que utiliza sondas de ADN o ARNm marcadas con un fluoróforo para detectar o confirmar expresiones génicas o cromosómicas que generalmente están más allá de la capacidad de resolución de la citogenética de rutina.

Los ácidos nucleicos, como otras macromoléculas, ocupan posiciones muy determinadas en las células y en los tejidos, de forma que, cuando estas moléculas se extraen por homogeneización, se pierde una gran cantidad de información potencial. Por ello, se han desarrollado técnicas en las que las sondas de ácidos nucleicos se utilizan, de forma similar a como se hace con los anticuerpos marcados, para localizar *in situ* secuencias determinadas de ácidos nucleicos, un proceso que se conoce como **hibridación *in situ***. Actualmente este proceso puede realizarse tanto para DNA en los cromosomas que hayan sido expuestos brevemente a un pH muy elevado para romper los pares de bases de su ADN. Entonces, las regiones cromosómicas que han fijado la sonda durante la hibridación se pueden visualizar. Originalmente estos métodos se desarrollaron utilizando sondas de ADN muy radiactivas, que se detectaban mediante autorradiografía. Sin embargo es posible mejorar la resolución espacial del método si se utilizan sondas de ADN marcadas químicamente en lugar de radiactivamente.

También se ha desarrollado métodos de hibridación *in situ* para poner de manifiesto la distribución de moléculas de ARN específicas en las células de los tejidos. En este caso, el ADN cromosómico se mantiene en forma de doble hebra y no puede unirse a la sonda, ya que los tejidos no son expuestos a un pH alto. En lugar de ello, el tejido se fija suavemente y su ARN queda retenido y expuesto de forma que puede hibridarse al incubarse con una sonda de ADN o ARN complementaria. De esta forma se pueden observar cambios en el patrón de expresión génica en los tejidos y determinar las posiciones en las células de ARN específicos. Por ejemplo, en nuestro caso detectar Arc nuclear y citoplasmático como producto de la activación en dos tiempos diferentes de ensambles neurales.

Apéndice II. Transcripción del ARN.

La transcripción es el mecanismo por el cual se sintetiza una molécula de RNA empleando como molde una molécula de DNA. En el caso de las células eucariotas, la transcripción se lleva a cabo en el núcleo celular, en el caso de la expresión del transcrito de Arc en mamíferos, esta ocurre tan rápidamente que es dentro de los 3 primeros minutos puede uno ubicarlo dentro del núcleo. La transcripción inicia en un sitio que puede ser específico o no y que se encuentra a cierta distancia de una secuencia conocida como promotor. La enzima implicada en la síntesis de ARN se conoce como ARN polimerasa. Esta enzima sintetiza el ARN empleando como sustrato los 4 ribonucleótidos trifosfatados (adenosina trifostato, uridina trifosfato, guanosina trifosfato y citosina trifosfato), los cuales serán unidos a través de un enlace fosfodiéster establecido entre el grupo OH de uno de los nucleótidos y uno de los tres fosfatos en posición 5' del nuevo nucleótido que será incorporado a la cadena, con la liberación de pirofosfato. La elección del nucleótido a incorporar, estará definido por la hebra que sirve como molde a la ARN polimerasa, respetando el apareamiento de bases A-T, G-C. Solamente es posible crecer hebras de ARN de la manera descrita previamente por lo que se dice que la síntesis se lleva a cabo en dirección $5' \rightarrow 3'$. Entonces, una hebra del ADN sirve como molde a la ARN polimerasa, mientras que la otra es la hebra que codifica. El ARN sintetizado tendrá una secuencia idéntica a la de la hebra que codifica (Alberts et al., 2002).

En eucariotes se conocen 3 ARN polimerasas, la ARN polimerasa I, II y III encargadas de sintetizar el ARN ribosomal, el ARNm y el ARN de transferencia respectivamente. Estas polimerasas para iniciar la síntesis de ARN necesitan de la participación de otras proteínas conocidas como factores de transcripción que les permiten anclarse al promotor. En el caso de la ARN polimerasa II, una vez que se ha unido al promotor y que ha iniciado la síntesis de ARN, sufre un cambio conformacional provocado por la adición de grupos fosfatos al extremo carboxilo terminal de la proteína, favoreciendo la liberación de estos factores de transcripción que la anclan al promotor. Esta liberación permite a la enzima elongar el ARN que ha iniciado hasta finalizar su síntesis.

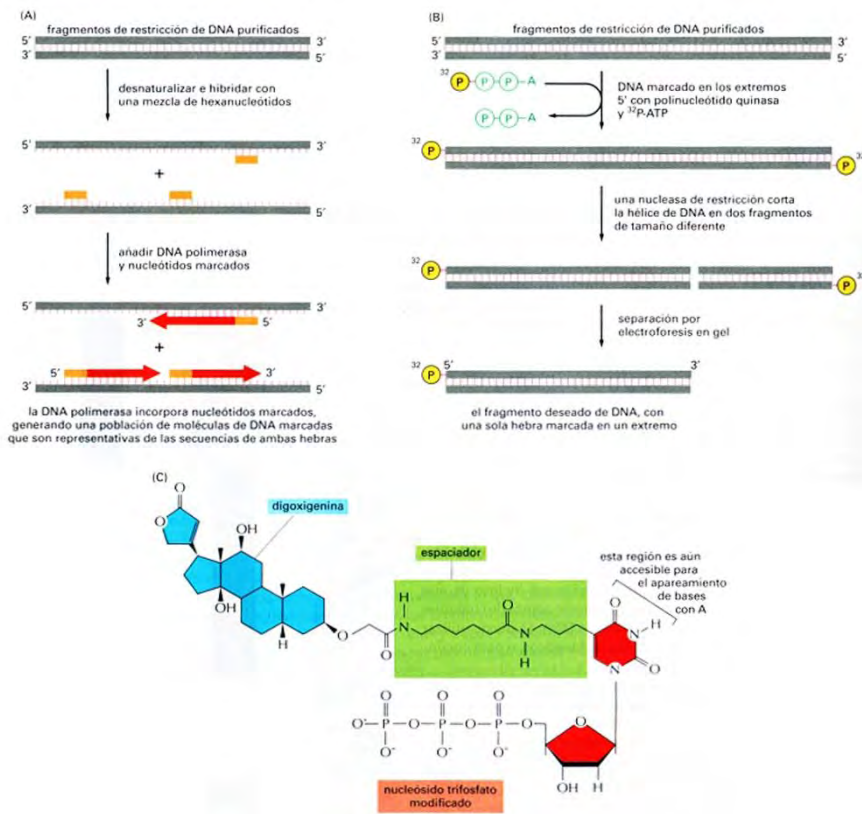
La velocidad a la cual se transcribirá una secuencia específica, dependerá de la fuerza del promotor la cual se entiende como la afinidad que la maquinaria de transcripción tiene por el mismo, de tal suerte que un promotor puede ser fuerte o débil.

De manera particular, el ARN transcrito por la ARN polimerasa II, tendrá que ser procesado antes de salir del núcleo para ser traducido en el citoplasma. En el extremo 5', se le adicionará una 7 metil guanosina, en el 3' se le adicionará una cola poly A, y se eliminarán las secuencias correspondientes a los intrones, a través de un proceso conocido como corte y empalme (splicing). Este ARN modificado se conoce como ARNm, que para Arc es a los 30 minutos.

El ARNm sale del núcleo y en el citoplasma es leído por los ribosomas para sintetizar la proteína. El proceso de fabricar una proteína siguiendo las instrucciones almacenadas en el ARNm se llama traducción ya que se pasa de un lenguaje de 4 letras (los 4 nucleótidos) en que están “escritos” el ADN y el ARN al lenguaje de 20 letras (los 20 aminoácidos) en que están “escritas” las proteínas (Alberts et al., 2002).

Apéndice III. Elaboración de sonda.

Se puede clonar cualquier fragmento del DNA que contenga un gen de interés. En biología celular el término **clonación del DNA** tiene un doble sentido. Por una parte se refiere literalmente a la acción de realizar copias idénticas de una molécula de DNA – es decir, a la amplificación de una secuencia concreta de DNA -. Sin embargo, el término también se utiliza para describir el aislamiento de un fragmento de DNA (un gen determinado) del resto del DNA de la célula, puesto que este aislamiento se ve facilitado en gran medida al realizar varias copias idénticas del DNA de interés.

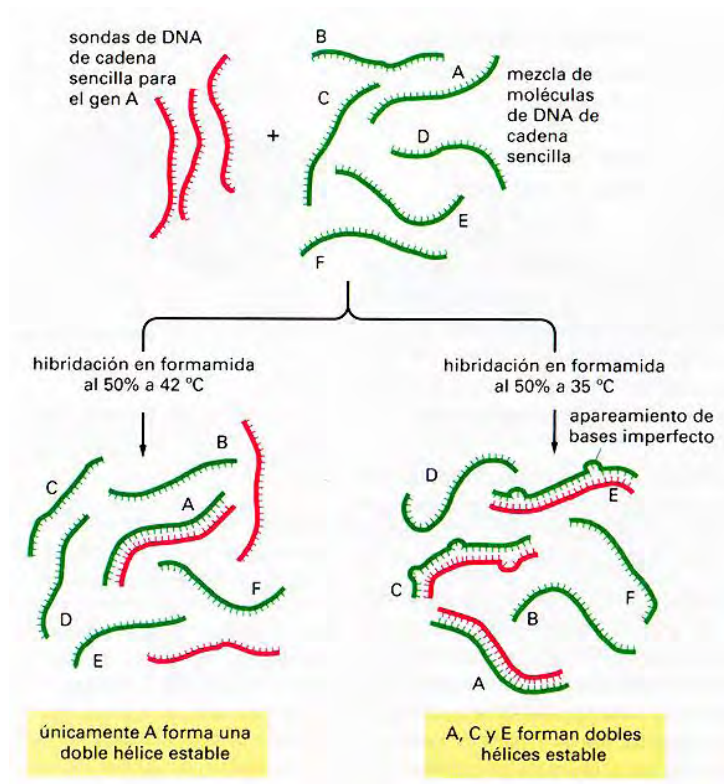


Luego entonces, la clonación de DNA puede realizarse de diferentes formas. La más sencilla supone la inserción de un fragmento particular de DNA en el genoma purificado de un elemento genético autorreplicativo como un virus o un plásmido. En un tubo de ensayo,

por ejemplo se puede unir un fragmento de DNA que contenga un gen humano con el cromosoma de un virus bacteriano; entonces, la nueva molécula de DNA recombinante podrá ser introducida en una bacteria. Partiendo de una sola molécula de DNA recombinante que infecta más de 10(12) moléculas idénticas de DNA vírico en menos de un día, amplificando por tanto el fragmento de DNA humano insertado en esta misma proporción. A los virus o plásmidos utilizados de este modo se les denomina *vectores de*

clonación y se dice que el DNA insertado que propagan ha sido *clonado* en ellos. Actualmente la clonación se realiza mayoritariamente con vectores plasmídicos.

Los **vectores plasmídicos** utilizados para la clonación de genes son pequeñas moléculas circulares de DNA de doble cadena, derivadas de grandes plásmidos que aparecen de forma natural en bacterias, como en nuestro caso es pBluescript II KS+. Generalmente suponen una pequeña parte del total del DNA de la célula huésped, pero se pueden separar fácilmente gracias a su menor tamaño respecto a las moléculas de DNA cromosómicas, las cuales son mucho mayores y sedimentan por centrifugación. Para utilizar los plásmidos circulares de DNA como vectores de clonación, una vez purificados se cortan con una nucleasa de restricción en este caso Xba 1 y Kpn 1, los fragmentos de restricción resultantes (entre los que están los que contienen el DNA que va a ser clonado) se añaden a los plásmidos cortados y se cierran, formando moléculas circulares de DNA recombinante. Estas moléculas recombinantes, que contienen insertos de DNA foráneo, se unen covalentemente mediante la enzima DNA ligasa.



El siguiente paso en la preparación consiste en introducir las moléculas circulares de DNA recombinante en bacterias que se han hecho temporalmente permeables al DNA: se dice que estas células han sido *transfectadas* con el plásmido. A medida que estas células van creciendo y dividiéndose (duplicando su número cada 30 minutos) los plásmidos recombinantes también van replicándose y produciendo un número enorme de copias de DNA circulares que

contienen el DNA foráneo. Muchos plásmidos bacterianos transportan genes que les confieren resistencia a los antibióticos, una propiedad que puede utilizarse para seleccionar las células que han sido transfectadas con éxito; si las bacterias se hacen crecer en presencia del antibiótico, solamente sobrevivirán las células que contengan los plásmidos. Cada una de las bacterias que fue transfectada contendrá, en general, un fragmento de DNA insertado diferente; este inserto será heredado por todas las células de la progenie de la bacteria, que formarán una pequeña colonia en una placa de cultivo.

Los plásmidos han sido utilizados durante años actualmente se utilizan unos vectores plasmídicos, basados en el plásmido F de *E. coli*, que aparece de forma natural en esta bacteria, para clonar fragmentos de DNA de entre 300,000 y 1 millón de pares de bases. El plásmido F y su derivado, el cromosoma artificial de bacteria (BAC) sólo presentan una o dos copias por célula de *E. coli*. Al existir pocos BAC en la célula, es menos probable que los fragmentos de DNA clonados queden fragmentados debido a recombinación con secuencias procedentes de otras copias del plásmido. Dada su estabilidad, su capacidad para aceptar grandes insertos de DNA y su fácil manejo, los BAC se han convertido en los vectores preferidos para generar bibliotecas de DNA de organismos complejos.

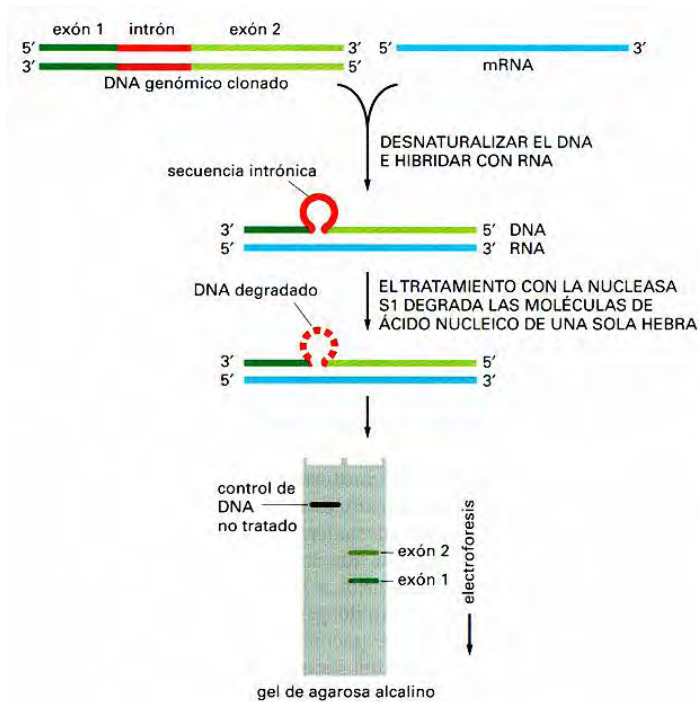
Una estrategia alternativa consiste en iniciar el proceso de clonación seleccionando las secuencias de DNA que se transcriben a RNA y que, por tanto, probablemente corresponden a genes. Esto se realiza mediante la extracción del mRNA (o de una subfracción purificada del mRNA) de las células y a continuación haciendo una copia de DNA complementario (cDNA) de cada una de las moléculas de mRNA presentes; esta reacción está catalizada por la enzima transcriptasa reversa de retrovirus, la cual sintetiza una cadena de DNA sobre un molde de RNA. Las moléculas de DNA de una sola cadena sintetizadas por la transcriptasa reversa se transforman en DNA de doble cadena mediante la DNA polimerasa, se insertan en vectores víricos o plasmídicos y se clonan. Cada uno de los clones obtenidos de esta forma se denominan **clon cDNA**, y la colección completa de clones derivados de una preparación de mRNA constituye una **biblioteca de cDNA**.

Hay importantes diferencias entre los clones de DNA geonómico y los de cDNA. Los primeros son una muestra al azar de todas las secuencias de DNA celular que se haya

usado. Los segundos sólo contienen las regiones del genoma que se han transcrito a mRNA. Como las células de diferentes tejidos contienen diferentes juegos de moléculas de mRNA, se obtendrá una biblioteca de cDNA diferente en función del tipo celular utilizado.

La hibridación de ácidos nucleicos es un método sensible para la detección de secuencias determinadas de nucleótidos.

Cuando una solución acuosa de DNA se calienta a 100°C o se expone a un pH muy alto (mayor a 13), se rompen las bases complementarias que normalmente mantienen unidas a las dos cadenas de la doble hélice, disociándose rápidamente en dos hebras separadas. Durante muchos años se consideró que este proceso, llamado *desnaturalización del DNA*, era irreversible. Sin embargo, en 1961 se descubrió que si se mantienen hebras complementarias de DNA a 65°C durante un período prolongado, forman de nuevo una doble hélice (**renaturalización** o **hibridación** del DNA). Reacciones de hibridación similares a ésta se producen entre dos cadenas cualesquiera de ácido nucleico de una sola hebra (DNA/DNA, RNA/RNA, o RNA/DNA) siempre que ambas cadenas tengan una secuencia de nucleótidos complementaria. Estas reacciones específicas de hibridación son



muy usadas para detectar y caracterizar secuencias nucleotídicas específicas en moléculas de RNA y DNA.

Las moléculas de DNA de cadena sencilla utilizadas para la detección de secuencias complementarias se conocen como **sondas**; estas moléculas contienen marcadores radioactivos o químicos que fluorescen para facilitar su detección y pueden tener

longitudes que van desde quince hasta varios miles de nucleótidos. Las reacciones de hibridación mediante sondas de DNA son tan sensibles y selectivas que pueden utilizarse

para detectar secuencias complementarias cuya concentración sea incluso de una sola molécula por célula. Así, es posible determinar el número de copias de cualquier secuencia de DNA presentes en una determinada muestra de DNA. Se puede utilizar esta misma técnica para buscar genes relacionados pero no idénticos o para encontrar un gen de interés en un organismo cuyo genoma no haya sido secuenciado, por ejemplo, utilizando un fragmento de un gen conocido como sonda.

Alternativamente, las sondas de DNA utilizadas en reacciones de hibridación con RNA en lugar de DNA, para detectar cuando está una célula expresando un gen determinado. En este caso se hibrida la sonda de DNA, que contiene parte de la secuencia del gen, con RNA purificado a partir de la célula en cuestión, con el fin de determinar si el RNA celular contiene moléculas de RNA de la célula. De esta forma se pueden determinar los lugares de principio y final de la transcripción del RNA, así como los límites precisos de los intrones y de los exones de un gen, como en nuestro caso el mRNA de Arc.

Actualmente las posiciones de los límites intrón/exón se determinan a partir de la secuenciación del cDNA, que representa los mRNA expresados por la célula. La comparación entre la secuencia expresada y la secuencia del gen completo revela la posición de los intrones.

Los genes se pueden activar o silenciar en respuesta a nuevas señales que la célula encuentra en su entorno. La hibridación de sondas de DNA con los RNA de la célula permite determinar si un gen está siendo o no transcrito; además, cuando la expresión de un gen cambia, es posible determinar si el cambio es debido a mecanismos transcripcionales o post-transcripcionales. Inicialmente estos estudios se realizaban con una sonda de DNA por ensayo. Actualmente los microchips de DNA permiten el estudio simultáneo de cientos o miles de genes en un solo ensayo. La utilización de los métodos de hibridación está actualmente tan extendida en biología celular que es difícil imaginar cómo podríamos estudiar la estructura y la expresión de los genes sin ellos.

Apéndice IV. Protocolo para cirugía y estimulación.

Materiales

| | |
|--|---------------------------|
| Mezcla de Xilacina y ketamina para tranquilizar (3:7) | Sevorane/sevoflurano (1%) |
| Máquina para rasurar | Metro |
| Parches para ojos | Cinta adhesiva |
| Tubo endotraqueal | Timer |
| Tanque de anestesia en gas | Gelfoam |
| Esterotáxico | Colaloca |
| Colchón calentador | Hielo seco |
| Epinefrina | 2-methyl-butano |
| Atropina | Alcohol etílico |
| Lápiz | |
| Bisturí | |
| Tijeras | |
| Pinzas | |
| Taladro | |
| Brocas | |
| Jeringa con solución fisiológica (hidratación de meninges) | |
| Cuchillo | |
| Pala o cuchara | |
| Anestésico local para preparaciones | |
| Pentobarbital para sacrificio | |

Procedimiento

- 1) El mono es tranquilizado con un mezcla de ketamina-xilacina (7:3mg-kg).
- 2) El mono es rasurado, en toda la zona cefálica y piernas.
- 3) Se entuba endotraquealmente al mono para la anestesia con gas Sevorane al 1%. Se amarra el tubo de anestesia al cuello con una gasa larga.
- 4) El mono es colocado en el estereotáxico. Se pone el colchón calentador debajo del mono y se miden los signos vitales del mono a lo largo de la cirugía.
- 5) Se tapan ambos ojos con parches especiales.
- 6) Se inyecta epinefrina en la zona media de la cabeza y se espera unos minutos.
- 7) Entonces, se hace una sola incisión con el bisturí, dividiendo toda la zona cefálica en dos hemisferios y se limpia el cráneo de todo el tejido conectivo y los tendones. Se corta la zona de anclaje de los músculos maxilares y se retiran los músculos sin daño.
- 8) Realizar corte de cráneo con el taladro, a lo largo de toda la base cefálica.
- 9) Retirar la tapa del cráneo sin lastimar meninges.
- 10) Exponer las meninges y mantenerlas hidratadas todo el tiempo.
- 11) Esperar 30 min. para establecer línea base.
- 12) Apagar todas las luces. Destapar un ojo y colocar el lente.
- 13) Presentar el primer estímulo por 3 Min. controlado desde el cuarto contiguo.
- 14) Tapar el ojo, permanecer con ambos ojos tapados por 30 Min.
- 15) Destapar el ojo y presentar el segundo estímulo durante 3 Min.
- 16) Cortar meninges y realizar corte entre el lóbulo parietal y frontal.
- 17) Realizar Corte basal a nivel de la corteza occipital hasta encontrar el primer corte.
- 18) Extraer los dos lóbulos temporales.
- 19) Sacrificio mediante pentobarbital endovenoso (20mg/kg).
- 20) Congelamiento del cerebro fresco rápidamente en una solución de 2-methly-butano enfriada mediante un baño en alcohol etílico y hielo seco. Almacenar a – 70°.

Tablas de Tiempos y Medidas

| ACTIVIDAD | MINUTOS |
|-----------------------|---------|
| Rasurado | 10 |
| Entubado | 10 |
| Estereotáxico | 5 |
| Incisión y limpieza | 15 |
| Corte del cráneo | 10 |
| Retirar tapa | 5 |
| Línea base | 30 |
| ESTIMULACIÓN | 36 |
| Cortar meninges | 1 |
| Corte frontoparietal | 0.5 |
| Corte basal occipital | 0.5 |
| Corte temporal izq | 0.5 |
| Corte temporal der | 0.5 |

| DE | A | CM |
|-------------|-----------------|-----|
| | Estímulos | 17 |
| Piso | Centro Estímulo | 105 |
| Pared sur | Centro Estímulo | 135 |
| Pared oeste | Mono | 103 |
| Pared oeste | Pantalla | 63 |
| Pantalla | Mono | 40 |
| Esq mesa | Centro Estímulo | 36 |

| ANGULO VISUAL (GRADOS) | DISTANCIA (CMS) |
|---------------------------|--------------------|
| 37.556 | 25 |
| 36.21 | 26 |
| 34.949 | 27 |
| 33.776 | 28 |
| 32.672 | 29 |
| 31.635 | 30 |
| 30.667 | 31 |
| 29.749 | 32 |
| 28.891 | 33 |
| 28.072 | 34 |
| 27.295 | 35 |
| 26.568 | 36 |
| 25.876 | 37 |
| 25.219 | 38 |
| 24.59 | 39 |
| 23.994 | 40 |

- Acetone/Methanol (1:1) *Mix "A/M" Container*

25ml Acetone

25ml Methanol

Place in -20°C freezer until called for

- Acetic Anhydride/Triethanolamine Solution

50 ml RNase Free H₂O

0.46 g NaCl

0.75 ml TEA (TriEthanolAmine) viscous! - rinse pipette in sol'n

Leave on stirrer until called for

* 250 µl Acetic Anhydride ***add with vigorous stirring***

immediately before use!

- 2X SSC (at least 1000ml) *Use RNase-Free 20 X SSC*

100 ml 20X SSC

900 ml RNase Free H₂O

- Preheat 50 ml of 0.5X SSC in microwave for ~20 sec
- 0.5X SSC @ 56°C in Incubator **30'**
- 0.5X SSC **5'**
 - Make Peroxide Solution
 - 50ml 1X SSC
 - 1.6ml 30% H₂O₂
- 1% H₂O₂/1X SSC **15'**
 - Longer if needed*
 - Thaw 1X Blocking Buffer (TSA) ± Goat Serum
 - Wash and/or prep immuno Humid Chamber
- 6 times 1X SSC-T **10'**
 - □ □ □ □ □
- TBS **5'**
 - Make TSA with 5% Goat serum
 - For 1200 µl of solution add:
 - 1140 µl of TSA
 - 60 µl of Goat Serum
- Apply 100-120µl (100µl) of TSA / 5% Goat serum and coverslip to each slide.
- Place slides in blue Humid Chamber with TBS
- Humid Chamber **30'-60'**
 - Thaw Anti-Dig Ab 1:800
 - Dilute in TSA
- Apply 100-120µl (100µl) Diluted Ab and coverslip to each slide
- Place in Humid Chamber with TBS
- Humid Chamber **2 Hours @ RT -or- Overnight @ 4°C**

Time In: _____

Time Out: _____

Temp: _____

DAPI 1:500 in TBS Blue

- Apply ~80µl solution and coverslip per slide
- Place slides into shielded Humid Chamber with TBS
- TBS 5' **Remove Coverslips Shielded**
- Check staining under microscope
- Apply 1 to 2 drops Vectashield Mounting Medium and coverslip to each slide
- Apply nail polish to seal edges of coverslip