



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**“Expresión de Arc en neuronas piramidales del hipocampo
de rata durante el LTP químico”**

T E S I S

Que presenta

Biol. Erick de Jesús Gómez Sánchez

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA

Directores de tesis

Dra. Claudia Pérez Cruz

Dr. Ubaldo García Hernández

Ciudad de México

Octubre, 2016

Esta tesis se desarrolló en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional en el laboratorio 32 del departamento de Farmacología, a cargo de la Dra. Claudia Pérez Cruz y en el laboratorio 15 del departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias a cargo del Dr. Ubaldo García Hernández, con el apoyo de CONACYT.

Dedicatoria

A mis papás Juan Carlos Gómez y Leticia Sánchez, por su gran ejemplo de fortaleza y por nunca limitar nuestras aspiraciones.

A mis hermanos Carlos, Karina e Isaac, porque teniéndolos en mi mente y corazón siempre fueron un gran aliciente para lograr esta meta.

A mi esposa Vanne, porque siempre ha sabido apoyarme y fomentar que dé lo mejor de mí.

Agradecimientos

Con mucho respeto, quiero agradecer a la Dra. Claudia por aceptarme en su laboratorio y brindarme su tiempo y apoyo para la realización de este proyecto.

De manera muy especial, quiero agradecer al Dr. Ubaldo García porque desde que tengo la fortuna de conocerlo, ha sido un gran mentor y amigo. Agradezco sus consejos y llamadas de atención siempre en el momento más oportuno. Siempre estaré muy agradecido por ser guía en mi formación científica.

Doy gracias a los revisores de este trabajo: Dra. Carmen Vivar, Dra. Carmen García y Dr. Benjamín Floran que se encargaron de dar los detalles finos para que esta tesis saliera de la mejor manera.

Quiero dar un agradecimiento muy especial a la Dra. María del Carmen Cárdenas Aguayo por todo el entusiasmo que puso para sacar adelante el proyecto en el peor de los momentos, así como por compartirme de su conocimiento para desarrollar las técnicas necesarias que llevaron a la obtención de mejores resultados y porque además de todo, me ha brindado su valiosa amistad. Mari, esta tesis también es tuya.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio de fisiología: Emmanuel, Eduardo, Santiago e Iván, así como a los del laboratorio de farmacología: Karina, Juan, a “las Brendas”, Tauqeer y al biólogo Lalo, por hacer de las horas de trabajo un tiempo más llevadero y sobre todo agradezco sus opiniones para la realización de este proyecto.

Doy gracias a Laura Gómez por su tiempo y amabilidad para ayudarme en la obtención de los Western blots.

Agradezco a Cristina por esas horas invertidas en el microscopio confocal para obtener excelentes imágenes.

Gracias a Giovanhi Gómez por su tiempo en la capacitación para que lograra los cortes con el criostato.

Especialmente agradezco a Monse, quien siempre estuvo en la mejor disposición para adelgazar las rebanadas de cerebro y nos ayudó a obtener lo que casi parecía imposible.

Gracias de manera muy especial, a todos aquellos que pasaron de ser solo compañeros y se convirtieron en piezas clave durante mi formación: Paco, Nahum, Miguel, Rossana, Saúl y Paola. Muchas gracias por sus consejos, pero sobre todo gracias por su valiosa amistad.

Gracias Isaac y Karina, mis pequeños hermanos que amo tanto. Gracias porque siempre han sido mi motivo para salir adelante tratando de ser un buen ejemplo para ustedes. Y a ti, Carlos, gracias porque has sabido ser un excelente hermano mayor y un ejemplo a seguir siempre.

Gracias a ti papá, porque sentaste una de las bases más importantes en mi vida: luchar siempre por salir adelante. Y a ti mamá, porque tu fortaleza, apoyo y amor nos ha llevado siempre más allá de los sueños. Gracias a ambos, por esa infancia tan dichosa y llena de sueños. He aquí uno más cumplido.

Doy gracias a mis abuelos paternos, Domingo y Naty quienes sin tener mucho, siempre han visto por entregarnos todo. A mi querida abuelita “Pita”, gracias porque ante nada nos has dejado caer y siempre has sido un ejemplo de esfuerzo y superación. A mi familia en general: tíos, primos y sobrinos (dejándolo así ya que no me perdonaría olvidar un solo nombre), quiero agradecerles por cada minuto de comprensión que me otorgaron al no poder asistir a una reunión por motivos de “el proyecto” y más aún por cada minuto de alegría cada que sí coincidíamos. Siempre me he sentido afortunado y dichoso por ser parte de una familia tan grande y amorosa.

Muy especialmente quiero agradecer a la familia Arellano Gutiérrez quienes se han convertido en mi segunda familia y que con gusto me ofrecieron su casa como mi segunda casa. Muchas gracias por su tiempo y espacio brindado a lo largo de este camino.

Desde el fondo de mi corazón doy gracias a mi esposa Vanne, aunque no hay palabras que cubran cuán agradecido estoy contigo y la vida por el honor de conocerte, doy gracias por cada minuto de tu vida invertido para que lográramos juntos este cometido, por siempre ser mi apoyo y aliento y no dejarme nunca caer, cumpliendo siempre esa promesa: si yo, tú...

Gracias a la vida misma, porque me permitió estar en el momento exacto para tener la dicha de coincidir con tan maravillosas personas que de alguna u otra forma dejaron huella y conocerlas me llevo a seguir por este maravilloso camino de la ciencia.

“La ciencia biológica [...] es realmente un dominio de infinitas posibilidades. Debemos esperar de ella los más sorprendentes esclarecimientos y no podemos adivinar qué respuesta dará, dentro de algunos decenios, a los problemas por nosotros planteados. Quizá sean dichas respuestas tales, que echen por tierra nuestro artificial edificio de hipótesis.”

Sigmund Freud, Más allá del principio del placer

Índice

Resumen	1
Abstract.....	2
Resumen gráfico.....	3
I. Introducción	4
<i>Neuronas como unidad morfo-funcional del cerebro</i>	5
<i>Espinas dendríticas</i>	7
Aprendizaje.....	9
La memoria como proceso	11
Potenciación y depresión a largo plazo (LTP y LTD).....	14
<i>Inducción eléctrica de la LTP en rebanadas hipocampales</i>	21
<i>Inducción química de la LTP en rebanadas hipocampales</i>	22
<i>El papel de la proteína Arc en la remodelación sináptica</i>	23
II. Hipótesis	27
III. Objetivos.....	27
Objetivo general	27
Objetivos particulares	27
IV. Materiales y métodos	28
<i>Animales</i>	28
<i>Obtención de rebanadas de cerebro</i>	28
<i>Registros electrofisiológicos</i>	29
<i>Identificación morfológica de las espinas dendríticas</i>	30
<i>Inmunofluorescencia de la proteína Arc</i>	31

<i>Análisis de Inmunofluorescencia para Arc</i>	33
<i>Determinación de Arc mediante la técnica de Western blot</i>	34
<i>Análisis estadístico</i>	36
V. Resultados.....	37
Efecto del 8-Br-AMPC en la actividad eléctrica de las neuronas piramidales del stratum pyramidale de la región CA1 del hipocampo	37
Efecto de la incubación con 8-Br-AMPC en la morfología de las espinas dendríticas de neuronas piramidales del hipocampo de rata	42
Efecto de la incubación con 8-Br-AMPC en la expresión de Arc en el hipocampo.....	45
VI. Discusión	51
Efecto del 8-Br-AMPC en la actividad eléctrica de neuronas piramidales de hipocampo de rata.....	51
Efecto de la incubación con 8-Br-AMPC en la morfología de las espinas dendríticas.....	55
Efecto de la incubación con 8-Br-AMPC en la expresión de Arc en el hipocampo.....	57
VII. Conclusiones	63
VIII. Perspectivas	64
IX. Referencias	65

Índice de figuras

Figura 1. Esquema representativo de una motoneurona.	7
Figura 2. Modelo de Atkinson y Shiffrin de la teoría de la memoria humana.	13
Figura 3. Inducción de la potenciación a largo plazo.	15
Figura 4. La inducción de la fase tardía de la LTP (I-LTP) con un análogo permeable del AMPc mejora la eficiencia sináptica	18
Figura 5. CaMKII juega un papel central en la dinámica de la actina.	20
Figura 6. La proteína Arc mantiene la homeostasis sináptica.	26
Figura 7. Localización e identificación de las neuronas del <i>stratum pyramidale</i> .	38
Figura 8. Imagen representativa del procedimiento marcaje de una neurona principal del <i>stratum pyramidale</i> con LY	39
Figura 9. Registros representativos en condiciones basales de la actividad eléctrica obtenidos mediante la técnica de patch-clamp en configuración de fijación de corriente.	40
Figura 10. Curvas corriente-voltaje de neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo.	41
Figura 11. El 8-Br-AMPC no afecta las propiedades electrofisiológicas de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo	42

Figura 12. Imágenes de microscopia confocal de dendritas de neuronas de la región CA1 del hipocampo inyectadas con LY.	43
Figura 13. Cuantificación del tipo de espinas dendríticas en rebanadas hipocampales incubadas con 8-Br-AMPC.	45
Figura 14. El 8-Br-AMPC modifica la expresión de la proteína Arc en hipocampo de rata.	46
Figura 15. Densitometría del efecto del 8-Br-AMPC en la expresión de la proteína Arc.	47
Figura 16. La incubación con 8-Br-AMPC modifica la expresión de Arc a nivel somático	49
Figura 17. Efecto del 8-Br-AMPC en la expresión de la proteína Arc en la región somática.	50
Figura 18. Curso temporal de diversos componentes sinápticos durante el desarrollo.	54

Abreviaturas

8-Br-AMPC	8-Bromoadenosin-3',5'-monofosfato cíclico
AC	Adenilato ciclasa
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
AMPC	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclica
ANOVA	Análisis de varianza
Arc	Proteína de citoesqueleto regulada por actividad
<i>Arg3.1</i>	Gen 3.1 regulado por actividad
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
CaMKII	Cinasa tipo 2 dependiente de calmodulina
HCN1	Canales activados por hiperpolarización operados por nucleótidos cíclicos
CREB	Proteína de unión a factores que responden al AMPC
CREs	Elementos que responden al AMPC
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
ECL	Método de luminiscencia incrementada
e-LTP	Fase temprana de la LTP
EPSPs	Potenciales Postsinápticos excitatorios
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GAPDH	Glyceraldehyde-3-fosfato deshidrogenasa
GEF	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina
HFS	Estimulación de alta frecuencia

IEGs	Genes de expresión temprana
IPSPs	Potenciales postsinápticos inhibitorios
LTD	Depresión a largo plazo
LTP	Potenciación a largo plazo
I-LTP	Fase tardía de la LTP
LY	Amarillo lucifer
NMDA	N-metil-D-Aspartato
PDE	Fosfodiesterasa
PI3K	Fosfatidil-inositol-3 cinasa
PKA	Proteína Cinasa A
PML-b	Promyelocytic leukemia bodies
Re	Resistencia de entrada
SRE	Elementos de respuesta de suero
SARE	Elemento de respuesta sensible a la actividad sináptica
TBS	Estimulación a ritmos theta
WB	Western blot

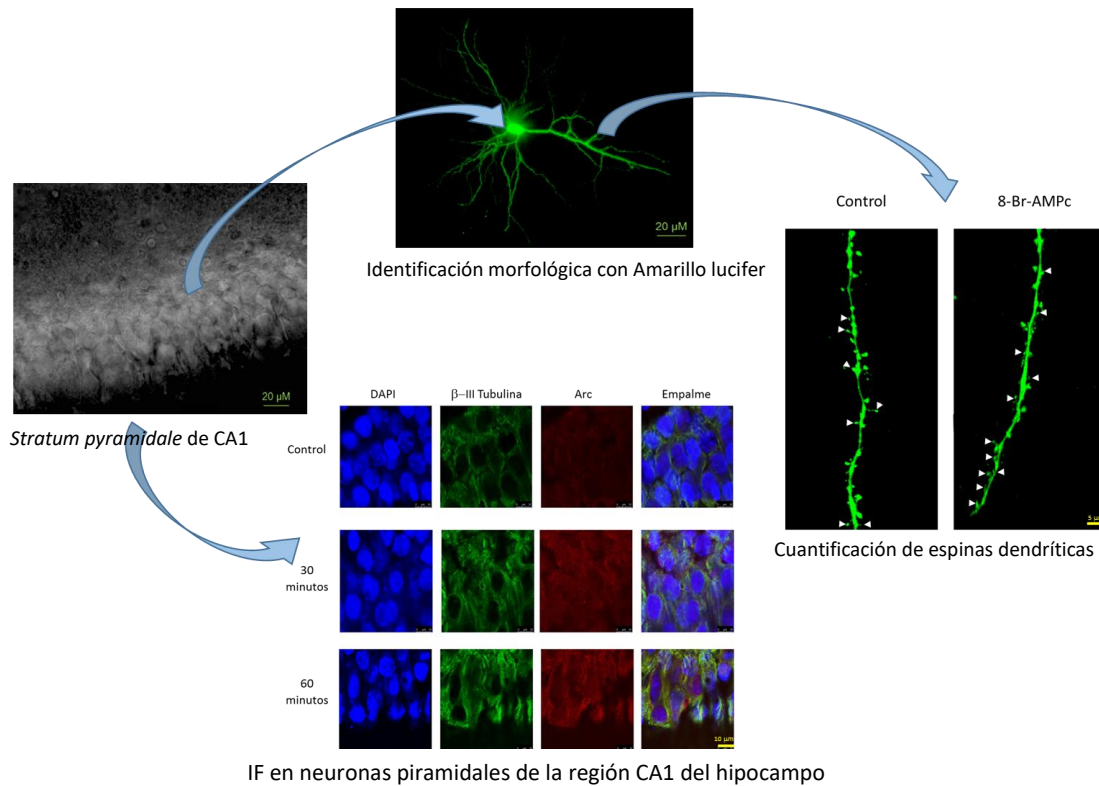
Resumen

La morfología de las espinas dendríticas es dependiente de la actividad sináptica. Los cambios plásticos que ocurren durante los procesos de memoria y aprendizaje han sido asociados con alteraciones en la expresión de la proteína Arc. En el presente trabajo, se evaluó el efecto de la estimulación neuronal mediante la incubación con un análogo permeable del AMPc (8-Br-AMPc) en los cambios morfológicos de las espinas dendríticas de las neuronas piramidales del hipocampo, así como en la expresión de Arc en rebanadas de rata de 14 días postnatales (PN14). Los resultados obtenidos indican que la estimulación con 8-Br-AMPc, induce cambios en la cantidad de la proteína Arc en el hipocampo. Mediante la técnica de inmunofluorescencia se observaron que estos cambios son a nivel somático exclusivamente. Además, se produjo un incremento en el número de espinas dendríticas de tipo delgado posterior a la incubación con 8-Br-AMPc. Sin embargo, la incubación con 8-Br-AMPc no modificó significativamente las propiedades eléctricas de las neuronas. Estos datos nos sugieren que la estimulación con 8-Br-AMPc en rebanadas de ratas PN14 logró actuar a nivel de segundos mensajeros causando cambios en la expresión de la proteína Arc y la morfología de las espinas dendríticas, pero no logró causar alteraciones en la excitabilidad de la neurona.

Abstract

The morphology of dendritic spines depends on synaptic activity. Plastic changes occurring during learning and memory processes have been associated with alterations in the expression of the Arc protein. In this work, we evaluated the effect of neural stimulation by incubation with a permeable analog of cAMP (8-Br-cAMP) and analyzed the morphological changes of dendritic spines of pyramidal hippocampal neurons as well as the expression of Arc protein. We used brain slices of postnatal day 14 (PN14) rat. The results indicated that stimulation with 8-Br-cAMP induces an increase of Arc protein in the hippocampus. By immunofluorescence technique it was observed that these changes are mainly at somatic level. In addition, there was an increase in the number of dendritic thin spines after incubation with 8-Br-cAMP. However, incubation with 8-Br-cAMP did not significantly modify the electrical properties of principal neurons. These data suggest that stimulation with 8-Br-cAMP in brain slices of rat PN14 was able to act at level of second messengers causing changes in the expression of the Arc protein and the morphology of dendritic spines, but failed to cause alterations in the neuronal excitability.

Resumen gráfico



El presente estudio describe el efecto que tiene en la expresión de la proteína Arc y la morfología neuronal la incubación de neuronas hipocámpales de la región CA1 con 8-Br-AMPC. Se observó que una incubación con 100 μ M durante 60 minutos de rebanadas frescas de rata de 14 días postnatales, incrementa la expresión de la proteína a nivel somático y este efecto coincide con un incremento en el número de espinas tipo delgada.

I. Introducción

Las preguntas siempre han estado ahí ¿cómo aprendemos?, ¿cómo recordamos? un cuestionamiento tan inquietante que ha sido abordado desde todos los puntos de vista posibles. La comprensión de la mente humana en términos biológicos se ha convertido en la tarea científica fundamental del siglo XXI. Hablar de aprendizaje es referirnos a los procesos en los que la conducta varía y se modifica a lo largo del tiempo, adaptándose a los cambios que se producen en el entorno, y al mismo tiempo, es hablar de memoria puesto que la memoria mantiene latente la información para poder generar un aprendizaje. Sin embargo, la memoria no sólo es esencial para la continuidad de la identidad sino para la transmisión de la cultura, la evolución y la continuidad de las sociedades a lo largo del tiempo.

Con los últimos avances en la ciencia, particularmente en biología molecular, se ha logrado amalgamar gran parte de los abordajes que se habían desarrollado para dar una explicación al tema de la memoria y el aprendizaje¹. Esto ha permitido darle gran peso a los procesos a nivel molecular que se desencadenan con los procesos mnemónicos como una forma más precisa de explicar que es lo que sucede en el cerebro al momento de adquirir un nuevo conocimiento.

A partir de las observaciones de Pavlov, Thorndike y Skinner, quienes describieron diferentes tipos de aprendizaje que relacionaron con la conducta

(una corriente que se le conoce como *conductismo*), se ha podido establecer que a consecuencia de lo que sucede en el ambiente exterior, hay una respuesta a diferentes niveles en el interior de un organismo^{1,2}. Estas respuestas pueden ser tanto a nivel periférico como a nivel del sistema nervioso central. A continuación, se revisarán brevemente algunos conceptos relacionados con las propiedades morfológicas y funcionales de las neuronas, así como de los fenómenos plásticos en la conectividad neuronal.

Neuronas como unidad morfo-funcional del cerebro

Hace unas décadas, el estudio de los procesos mentales por áreas ajenas a la psicología, era considerado un imposible³. Tras el desarrollo de la teoría celular y con la llegada de la teoría neuronal en el siglo XIX desarrollada por Ramón y Cajal, las ideas sobre el cerebro, su estructura y funcionamiento fueron esclarecidas, permitiendo ver a la neurona como la estructura morfo-funcional básica del cerebro y como una pieza fundamental para entender los fenómenos conductuales^{3,4}.

Se ha estimado que, en un cerebro humano adulto, existen cerca de 10^{11} neuronas⁵, cada una de las cuales está conectada con otras miles. En la Figura 1 se muestran los elementos estructurales típicos de una neurona que a continuación se describen brevemente:

Soma, es la región de la neurona donde está concentrada la maquinaria genética y metabólica.

Cono axónico, región donde ocurre la integración de la entrada sináptica (axón hillock) y donde la densidad de canales de sodio (Na^+) es alta y el umbral es bajo⁶.

Dendritas, son extensiones de la neurona, típicamente ramificadas y relativamente cortas (respecto al axón). Son las estructuras que sirven como entrada principal de la información, gracias a que en su superficie existen protuberancias que son el punto de comunicación con la terminal sináptica del axón, llamadas espinas dendríticas⁶.

Axón, estructura única, puede ramificarse en su extremo final y tiene la función de propagar la señal generada desde el cono axónico en forma de potencial de acción, hasta el punto de comunicación con las siguientes células, la terminal sináptica⁷. Algunas neuronas, como las motoneuronas, poseen un recubrimiento en el axón conocido como vaina de mielina, las cuales son proyecciones oligodendrocíticas que envuelven al axón y le ayudan a propagar los impulsos eléctricos.

Terminal sináptica, es el punto final del axón donde entra en comunicación con un sitio de la célula receptora para formar una sinapsis. Existen varios tipos de sinapsis de acuerdo al sitio donde el axón hace contacto: sinapsis axo-

axónicas, axo-dendríticas y axo-somáticas, siendo las más comunes en el hipocampo, las axo-dendríticas⁶.

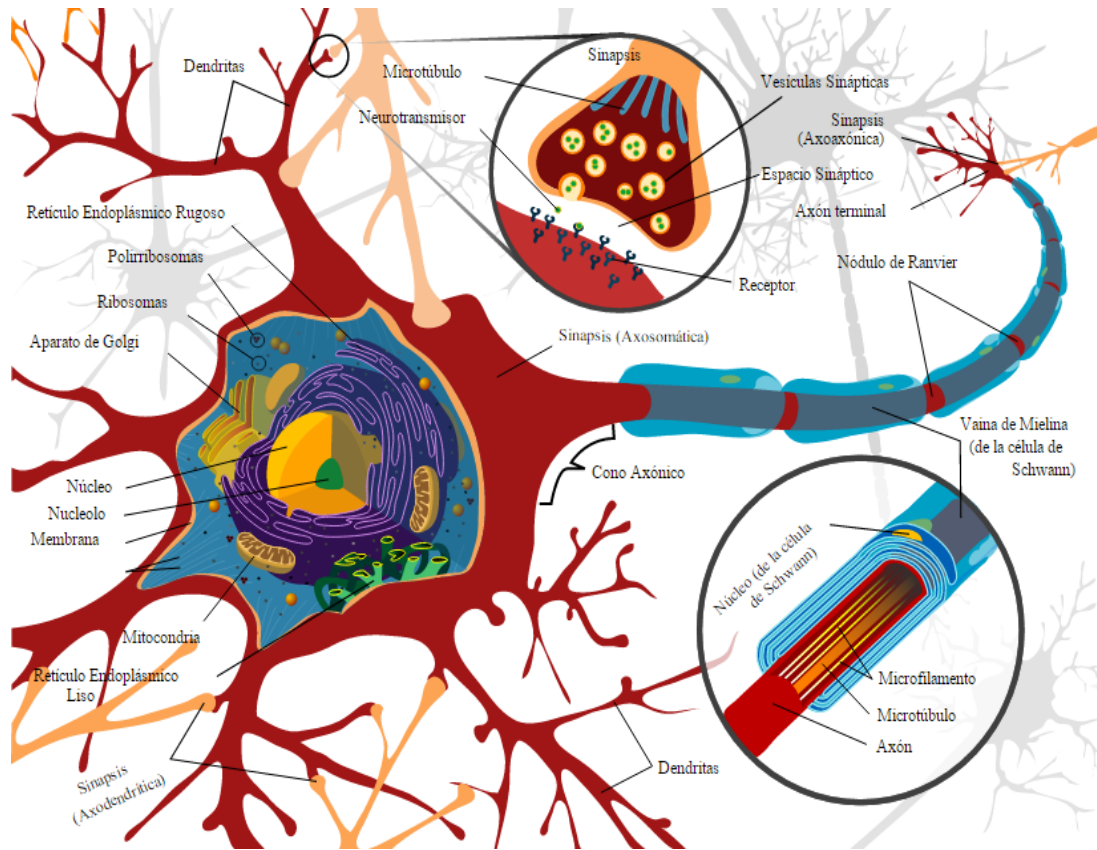


Figura 1. *Esquema representativo de una motoneurona.* Se muestran los elementos morfológicos principales como soma, axón, dendrita y terminal sináptica. Además, los componentes funcionales como el cono axónico, la vaina de mielina, los nodos de Ranvier, diversos receptores, mitocondrias, el núcleo, entre otros. Tomado de Ruiz-Villareal M., 2009.

Espinas dendríticas

Para recibir la información, las neuronas poseen estructuras en las dendritas denominadas espinas dendríticas^{6,8}. Las espinas dendríticas son estructuras con un alto dinamismo o plasticidad, es decir, son altamente modificadas, creadas y destruidas en función de la actividad⁹⁻¹¹, adquiriendo diversidad de

formas a las cuales se les ha intentado dar diferentes clasificaciones de acuerdo a la morfología que exhiben^{12,13}. Hasta el momento, se acepta una clasificación muy general como: delgadas, hongo, regordetas, y filopodio¹⁴⁻¹⁶.

Las espinas dendríticas delgadas son aquellas en las que la longitud del cuello desde la dendrita de la cual surgen, es más larga respecto a la longitud de su cabeza. Las espinas en hongo presentan un cuello más corto y estrecho con respecto a la longitud de su cabeza. Estos dos tipos de espinas presentan densidad postsináptica, por lo que se asume que están formando sinapsis funcionales. La densidad postsináptica es un conjunto de proteínas ancladas a la membrana postsináptica, y su abundancia se asocia a la presencia de una sinapsis activa. Por otro lado, las espinas regordetas se caracterizan por la carencia de un cuello que diferencie su cuerpo de la cabeza, de manera que la longitud total de la espina es básicamente igual o incluso menor a su diámetro, difiriendo de las dos anteriores en que no presentan una densidad postsináptica definida y por tanto se asume que no están formando sinapsis activas. Finalmente, los filopodios son estructuras más largas que las espinas (<3-5 μm) y carecen de una cabeza que se diferencie del cuello (se dice que son proto-espinas en busca de contacto sináptico)¹⁷.

Las espinas dendríticas están compuestas de un citoesqueleto de actina involucrado en procesos plásticos¹⁸⁻²⁰, como motilidad, estabilidad, forma y tamaño. Los cambios en el citoesqueleto de actina de las espinas dendríticas

están relacionados con cambios en la eficiencia sináptica, y tienen asociados cambios en la organización de la densidad postsináptica, así como en la modulación y transmisión de la señal en la sinapsis. Las alteraciones de la fuerza sináptica son la forma más descriptiva del término plasticidad neuronal. Si consideramos a las espinas dendríticas como el elemento más plástico en cuanto a su capacidad de modificar forma y tamaño en función de la actividad, no es de sorprender que tengan un papel central en los fenómenos que modifican la fuerza sináptica, como la memoria y el aprendizaje^{12,21}.

Aprendizaje

El aprendizaje, es una capacidad presente en mayor o menor medida, en todas las especies animales. Constituye un mecanismo que permite la adaptación y en muchos casos, supervivencia en el medio ambiente. En un inicio, se pensaba que el aprendizaje era una habilidad exclusiva de los humanos. No obstante, diversos estudios han demostrado que cada especie posee mecanismos de aprendizaje con diversos grados de complejidad^{22,23}. Esto da la pauta para entender las dificultades a las que se han enfrentado los especialistas para dar una clasificación adecuada a los tipos de aprendizaje. Por ejemplo, una de las formas más elementales de aprendizaje que se puso de manifiesto es la “*habituación*” gracias a experimentos realizados en moluscos (*Aplysia californica*) por Eric Kandel^{6,22}. Este tipo de aprendizaje consistente en la reducción de la fuerza de las reacciones reflejas a un

estímulo cuando éste se presenta repetidamente, ocasionando así, un silenciamiento de las neuronas presinápticas. Por otro lado, en este mismo modelo de invertebrado, la estimulación paralela de diferentes neuronas resulta en una *sensibilización*, es decir, se produce una respuesta mayor a estímulos subsecuentes debido a una mayor liberación de neurotransmisores por las neuronas presinápticas, causando una mayor entrada de Na^+ y de calcio (Ca^{2+}) en la terminal postsináptica²². De esta forma, se pudo entender en un invertebrado dos formas de aprendizaje que involucran una red neuronal muy sencilla. En organismos más evolucionados, como los mamíferos, las redes neuronales involucradas en el aprendizaje son más complejas. Sin embargo, el mismo tipo de respuestas (ej. habituación y sensibilización) están presentes en procesos cognitivos complejos.

El hecho de que la conducta sea modificada en función de las condiciones ambientales es posible gracias a una compleja serie de procesos que tienen lugar en el interior del organismo. La adaptación de la conducta al ambiente está mediada por procesos perceptivos, cognitivos y de organización motora. Ello significa que el sistema biológico (ej. el cerebro) debe procesar los estímulos del ambiente, comparar el resultado de ese procesamiento con el conocimiento anterior y organizar una respuesta motora a estos estímulos. Así, el aprendizaje nos permite resolver problemas que afrontamos a diario evocando simultáneamente varios hechos a la vez, una habilidad vital para la resolución de problemas. En un sentido más amplio, confiere continuidad a

nuestra vida al brindar una imagen coherente del pasado que pone en perspectiva la experiencia actual. En palabras de Kandel: *“somos quienes somos por obra de lo que aprendemos y de lo que recordamos”*.

El aprendizaje entonces, es un proceso de cambio en el estado de conocimiento del sujeto y, por consecuencia, en sus capacidades conductuales: como tal, es siempre un proceso de adquisición mediante el cual se incorporan nuevos conocimientos y/o nuevas conductas y formas de reaccionar al ambiente. Puesto que el aprendizaje implica siempre alguna forma de adquisición de información y, por lo tanto, una modificación del estado de la memoria del sujeto, puede decirse que aprendizaje y memoria son fenómenos interdependientes.

La memoria como proceso

En términos prácticos, la memoria es la expresión de que ha ocurrido un aprendizaje. De ahí que los procesos de memoria y de aprendizaje sean difíciles de estudiar por separado. Se distinguen tres fases que se relacionan entre sí para recordar una experiencia: 1) dicha experiencia debe ser almacenada (memoria a corto plazo); 2) luego debe ser codificada u organizada de tal manera que tenga significado; y, por último 3) esta experiencia ya codificada debe ser recuperada (memoria a largo plazo)²⁴⁻²⁶.

En la Figura 2 se muestra el modelo de la teoría multialmacén desarrollada por Atkinson y Shiffrin en 1968 para explicar como funciona la memoria humana^{27,28}. El estímulo proveniente del ambiente genera un recuerdo sensorial generalmente muy lábil. Aún cuando llama la atención del individuo, si el estímulo se presenta sin un reforzamiento, solo se genera una memoria a corto plazo. Este tipo de memoria es también conocida como memoria de trabajo ya que puede perdurar por minutos y en algunos casos horas. Sin embargo, si no se recibe un reforzamiento del estímulo, puede perderse con el tiempo. En cambio, si el reforzamiento del estímulo se da en un periodo de tiempo corto y de manera repetitiva, se forma una memoria a largo plazo, a la que tenemos acceso de manera voluntaria en cualquier momento de nuestra vida²⁴. Como se puede advertir en la descripción anterior, la duración del estímulo es un evento clave para poder pasar de un tipo de almacenamiento a otro.

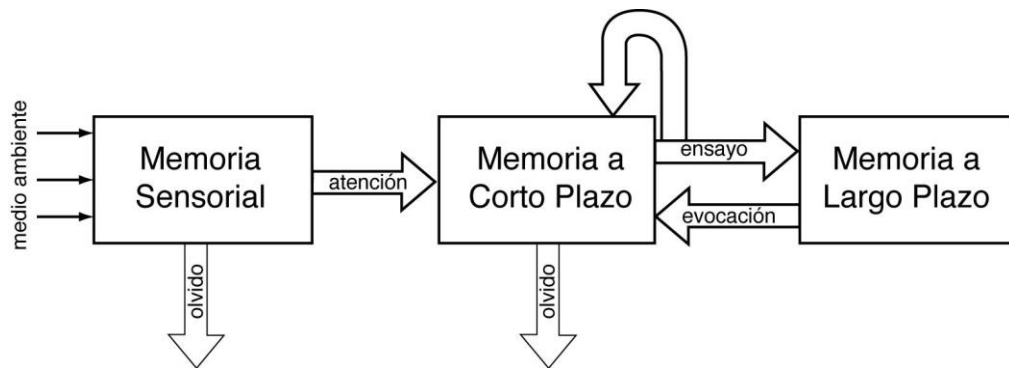


Figura 2. *Modelo de Atkinson y Shiffrin de la teoría de la memoria humana*. Presentaron un modelo de multi-almacén el cual hace referencia a cuanto un estímulo es capaz de llamar la atención como pauta para la generación de memoria. Cuando un estímulo ambiental es percibido y no demanda suficiente atención, se olvida. En cambio, si se le presta atención suficiente, da pie a una memoria a corto plazo. Esta nueva memoria adquirida requiere de ensayo para generar una memoria duradera o de largo plazo que puede ser re-evocada. Tomado de Jáuregui y Razumiejczyk, 2011²⁸.

Este fenómeno de causa-efecto entre los estímulos sensoriales y la respuesta a nivel fisiológico, fue observado y descrito por primera vez en un sistema neuronal por Donald Hebb. Entre sus observaciones, se dio cuenta de que al estimular una vía aferente que estuviera lo suficientemente cerca de una eferente, produce en ambas una serie de cambios metabólicos de manera tal que, tanto la eficiencia de respuesta como la de estimulación van a ser aumentadas. Esto implica que las neuronas además de estar interconectadas, ejercen influencia entre sí para generar una respuesta. La teoría de Hebb menciona entonces: “aquellas sinapsis que se usan, perduran, mientras que las que no se utilizan, desaparecen” relacionando así no solo la actividad de una neurona presináptica sino también los cambios morfológicos que se producen en las neuronas postsinápticas^{29–31}.

Posteriormente, en 1973, Bliss y Lomo describieron otro fenómeno relacionado a la estimulación repetida de una neurona: la potenciación a largo plazo (LTP del inglés, Long-Term Potentiation)³². Estudios posteriores *in vitro* demostraron que la LTP no es solamente un fenómeno duradero, sino también de inducción rápida, con características asociativas y de especificidad de estímulos. Así mismo, se han descrito estados temporales (LTP-temprano y LTP tardío) que acompañan a las fases de adquisición de ciertos tipos de memoria dependientes del hipocampo³³⁻³⁵, lo que convirtió a la LTP en un proceso idóneo para describir el mecanismo celular del aprendizaje y la memoria.

Potenciación y depresión a largo plazo (LTP y LTD)

El fenómeno de LTP ya antes mencionado, se refiere al efecto que tiene la estimulación repetida de una vía aferente o de entrada (*input*) en la respuesta de la vía eferente o de salida (*output*) para generar una respuesta de mayor intensidad y duración. La descripción de este fenómeno, pone de manifiesto que las vías de comunicación neuronal son muy sensibles a la historia de la actividad previa. Así, al estimular a las neuronas presinápticas de una forma definida se pueden generar cambios en la respuesta postsináptica y estos cambios pueden ser vistos a través de los potenciales postsinápticos excitatorios (EPSPs, del inglés Excitatory Postsynaptic Potentials) e inhibitorios (IPSPs, del inglés Inhibitory Postsynaptic Potentials)³². Estos fenómenos,

modifican el potencial de membrana, y presentan un fenómeno aditivo, así un incremento en la cantidad de EPSPs favorece la generación de un potencial de acción postsináptico. Por el contrario, la sumación de IPSPs disminuyen la probabilidad del disparo disminuyendo la excitabilidad, este fenómeno es conocido como depresión a largo plazo o LTD (del inglés, Long-Term Depression)³⁶. La Figura 3 ilustra el mecanismo de potenciación a largo plazo en su fase temprana en una sinapsis de tipo excitatorio entre las fibras colaterales de Schaffer (CA3) y las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo.

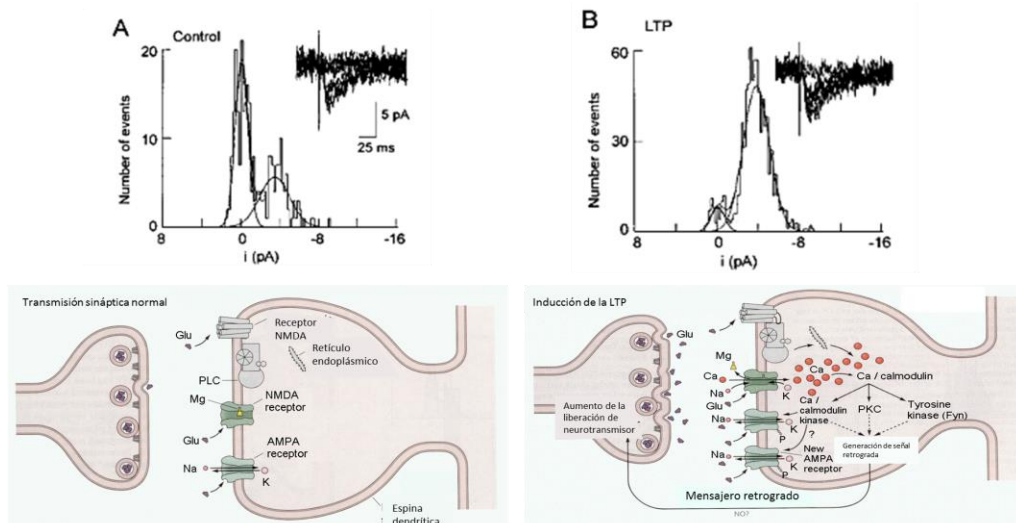


Figura 3. *Inducción de la potenciación a largo plazo.* Durante la transmisión sináptica normal (A) se generan respuestas nulas o bien, miniatura, existiendo un mayor número de eventos fallidos. La distribución de las amplitudes puede ser ajustada a dos curvas Gaussianas, una centrada en cero (eventos fallidos) y la otra curva, centrada en -4 pA (la respuesta máxima). En esta etapa, solo hay activación de receptores AMPA, mientras que los NMDA se mantienen bloqueados por el Mg²⁺. Con la inducción de la LTP (B), la sensibilidad de la neurona postsináptica a los neurotransmisores excitatorios incrementa y la distribución Gaussianas se mantiene, pero ahora con un incremento en el número de eventos donde la respuesta es máxima. En este momento a nivel molecular existe activación de receptores NMDA que permiten la entrada de más Ca²⁺ lo que favorece una despolarización de la membrana al tiempo que se activan vías de señalización para activar a otros receptores AMPA en la membrana e insertar nuevos receptores AMPA y NMDA. Modificada de Kandel et al., 2001.

La liberación de glutamato en la terminal sináptica ocasiona que este neurotransmisor se una a sus receptores, en primera instancia a los AMPA permitiendo la entrada de Na^+ , y produciendo un cambio en la polaridad de la vecindad de la membrana postsináptica provocando que se activen canales dependientes de ligando, entre ellos los NMDA. Los receptores NMDA están bloqueados por magnesio (Mg^{2+}). Después de una despolarización de la membrana, el Mg^{2+} libera al receptor, así entonces el receptor de NMDA es sensible a la acción del glutamato, permitiendo la entrada de Ca^{2+} y una mayor despolarización membranaral³⁷.

Los receptores de NMDA son permeables a Ca^{2+} (principalmente) y Na^+ ^{5,6}. Se ha demostrado que la entrada de Ca^{2+} a través de los NMDAR durante una despolarización, juega un papel fundamental en la activación de cinasas como la CaMKII que ayudan en el establecimiento y desarrollo del LTP en su etapa temprana^{38,39}. La entrada de Ca^{2+} activa a la calmodulina formando un complejo conocido como Calcio/calmodulina que a su vez activa a la adenilato ciclasa (AC) y a la CaMKII.

En la etapa tardía, existe un cambio en la concentración de AMPc que desencadena síntesis de nuevas proteínas, por lo que esta fase del LTP, es dependiente de la síntesis de proteínas de *novo*⁴⁰⁻⁴².

En la Figura 4 se esquematiza la vía por la cual la adenilato ciclasa activada va a generar AMPc a partir del ATP presente en la neurona. La concentración

intracelular del AMPc, que en condiciones basales es $\leq 1\mu\text{M}$, es un factor importante en su mecanismo de señalización, y puede variar rápidamente, aumentando o disminuyendo en respuesta al estímulo extracelular⁵. Los dos factores claves en la regulación de estos niveles son: la modulación de la producción del AMPc por la AC y la actividad de la fosfodiesterasa (PDE) que degrada el AMPc a 5'-AMPc.

El AMPc, una vez sintetizado por las AC, actúa como segundo mensajero intracelular interaccionando con diferentes tipos de proteínas como son la proteína cinasa A (PKA), el factor de intercambio de nucleótido de guanidina (GEFs del inglés, Ras superfamily guanine nucleotide exchange factor), canales iónicos activados por hiperpolarización operados por nucleótidos cíclicos (HCN del inglés, Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels) el factor de transcripción CREB (del inglés, cyclic AMP response element binding protein), entre otros, que son los sistemas efectores de la respuesta celular al estímulo inicial o ligando^{40,43,44}.

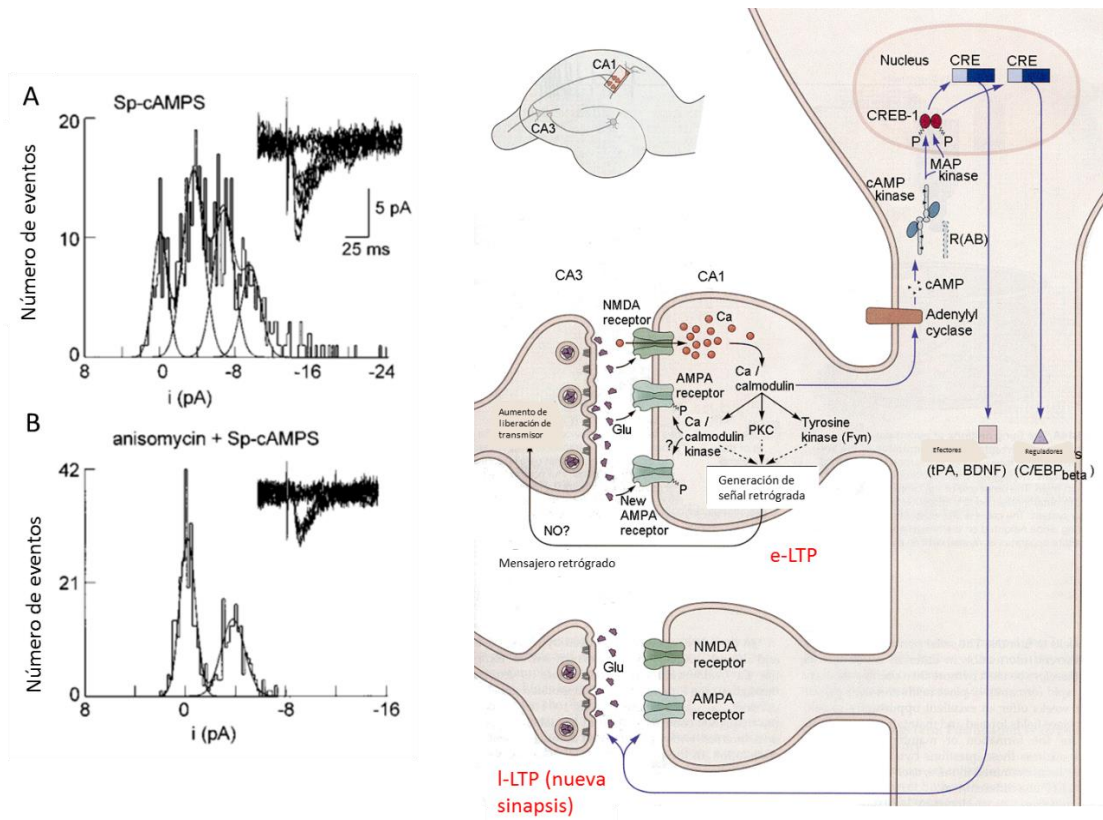


Figura 4. La inducción de la fase tardía de la LTP (I-LTP) con un análogo permeable del AMPc mejora la eficiencia sináptica. Cuando se induce la fase tardía de la LTP con el Sp-AMPC, la distribución de las respuestas no se ajusta a solo dos curvas Gaussianas, sino que son necesarias tres curvas como se muestra en A), sugiriendo la posibilidad de que tanto nuevas zonas presinápticas han sido activadas como nuevos receptores a nivel postsináptico han sido insertados acompañados del crecimiento de nuevas espinas dendríticas. Sí se aplica anisomicina, un bloqueador de la síntesis de proteínas, el fenómeno de LTP es bloqueado (B), indicando que esta segunda fase de la LTP es dependiente de la síntesis de proteínas. Modificada de Kandel et al., 2001.

Por otro lado, recordemos que la entrada de calcio también activa a la CaMKII. La Figura 5 ilustra que, en estado basal, la cinasa está unida a los filamentos de actina (F-actina) estabilizando la estructura de la espina dendrítica. De esta manera, se mantiene lejos de la densidad postsináptica. La disociación de la

CaMKII de la actina provoca su translocación hacia la densidad postsináptica donde puede fosforilar a otros receptores AMPA ya instalados y activarlos, al mismo tiempo que permite que el citoesqueleto se reorganice³⁹. La CaMKII participa en la reorganización del citoesqueleto al fosforilar al GEF kalirin-7 que a su vez activa a la GTPasa pequeña Rac1 cuya activación finalmente conduce a la inactivación de la cofilina, una proteína de unión a actina que sirve de para estabilizar a los filamentos de actina. Eventualmente, CaMKII regresa a su estado inactivo y se une a la reorganizada F-actina restableciendo la estructura de la espina dendrítica⁴⁵. En todo este proceso, llama especialmente la atención la celeridad (minutos) con la que los estímulos sensoriales que modifican la actividad eléctrica, son capaces a su vez de producir cambios morfológicos en el circuito nervioso como aquellos asociados a las espinas dendríticas. Dado que la acumulación de la cinasa y de las vías que desencadena, ocurre de manera inmediata a una estimulación, se considera a la activación de la CaMKII como un elemento crucial en la formación de memoria a corto plazo ya que se ha visto relacionada a fenómenos como la etapa temprana del LTP (e-LTP, del inglés early-LTP)⁴⁶.

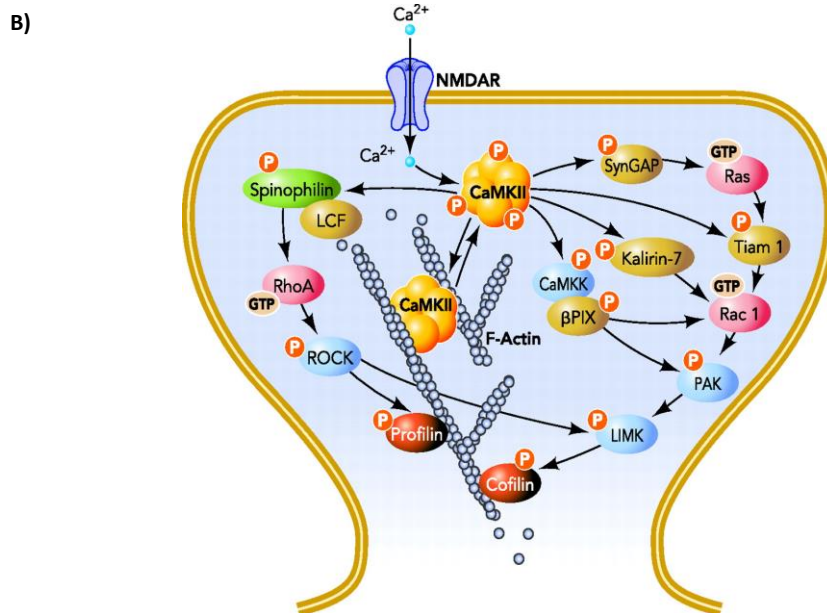
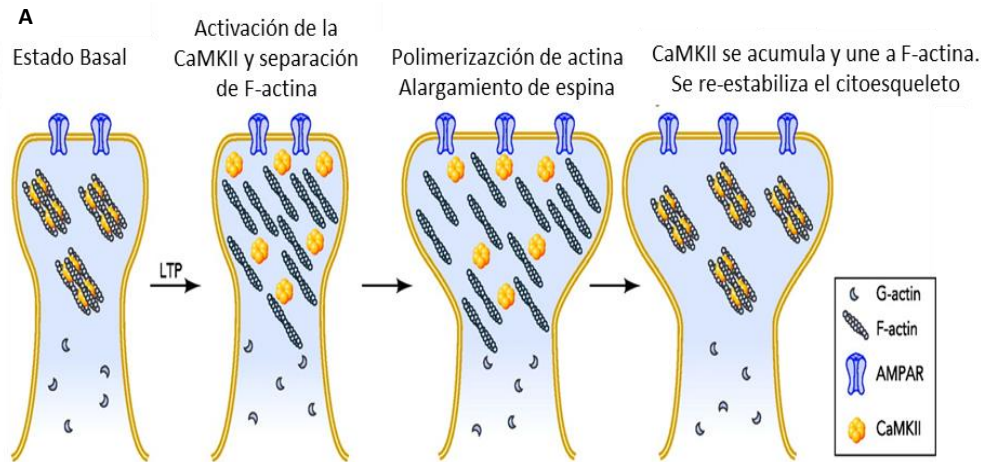


Figura 5. *CaMKII* juega un papel central en la dinámica de la actina. Para que existan modificaciones morfológicas, es necesario que el citoesqueleto sea remodelado y en las espinas dendríticas, la *CaMKII* tiene un importante papel en la regulación del remodelado del citoesqueleto. Como se muestra en a) cuando se activa a la *CaMKII* se separa de la F-actina permitiendo que esta modifique su posición y polimerice, ejerciendo cambios morfológicos en la espina dendrítica. El efecto que se desencadena a partir de la activación del receptor NMDA se observa en b) donde están ilustradas las vías de señalización dependientes de la activación de la *CaMKII*. Como es de notar, la activación y separación de la *CaMKII* de la F-actina activa concomitantemente vías que llevan a la remodelación del citoesqueleto vía GTPasas pequeñas como la RhoA. Modificada de Okamoto et al., 2009.

Inducción eléctrica de la LTP en rebanadas hipocampales

El fenómeno de la LTP ha sido estudiado en diferentes modelos que han permitido evaluar este fenómeno en su forma más nativa. Puede ser evocado en células en cultivo, en rebanadas frescas de hipocampo e *in situ*, siendo las rebanadas el modelo que ofrece más ventajas con respecto a otras técnicas, ya que mantiene las conexiones neuronales naturales y al mismo tiempo permite evaluar el efecto de los fármacos de interés. Así mismo, ofrece facilidades técnicas ya que no requiere medios especiales para el crecimiento de las neuronas, ni equipo muy sofisticado para el desarrollo de los experimentos como el caso de las técnicas *in vivo*.

Para ser evocado, existen diferentes técnicas electrofisiológicas que permiten estudiar el fenómeno de LTP⁴⁷, en las que se administra estimulación mediante descargas eléctricas de alta frecuencia (HFS, del inglés High Frequency Stimulation), esto es, se aplican trenes de estimulación de 200 ms a una frecuencia de entre 30 y 100 Hz dejando 30 segundos de reposo entre cada estimulación. O bien, las descargas pueden ser a ritmos theta (TBS, del inglés Theta Burst Stimulation) con frecuencias de entre 5 a 12 Hz. En ambos casos, el estímulo se induce gracias a un electrodo de estimulación localizado en la vía eferente y el efecto se observa gracias a un electrodo de registro en la vía aferente⁴⁸⁻⁵⁰. Cabe destacar que la inducción de la fase tardía de la LTP, requiere registros de varias horas (aproximadamente de 2-4) posteriores a la

inducción eléctrica^{33,41} lo que llevó a explorar otras formas de inducir el fenómeno.

Inducción química de la LTP en rebanadas hipocampales

Bolshakov y col., en 1997, realizaron el análisis de la inducción de la LTP mediante el sistema tradicional que involucra el electrodo de estimulación y el electrodo de registro y lo compararon con la inducción química mediante un análogo permeable del AMPc, el 8-Br-AMPc (8-bromoadenosin-3',5'-monofosfato cíclico). Como se explicó en el apartado anterior, la acumulación de AMPc en el interior de las espinas dendríticas debido a periodos de alta actividad, juega un papel crucial en el establecimiento y mantenimiento tanto de los cambios morfológicos asociados a la actividad como del fenómeno de la LTP a largo plazo.

En su análisis observaron que la inducción química de la LTP mejora la probabilidad de registrar un evento exitoso; es decir, después de inducir químicamente el fenómeno, la mayoría de las neuronas registradas estaban potenciadas. Esto, lo atribuyeron a que teóricamente se está potenciando a todas las sinapsis, a diferencia de lo que sucede en cuando el fenómeno se consigue eléctricamente: se potencia a la neurona estimulada y en su caso a las que estén asociadas sinápticamente con esta. Con la estimulación química se reducen los tiempos de espera ya que se consigue de manera directa el establecimiento de la fase tardía del LTP y de esta forma, se evita el paso por

la fase temprana^{41,51}. El uso de análogos permeables del AMPc para estudios de vías dependientes del AMPc está ampliamente reportado^{41,42,52-54}. En este trabajo, empleamos el 8-Br-AMPc, un análogo permeable que es resistente a la acción de las fosfodiesterasas, lo que le permite un tiempo mayor de acción en el interior celular.

El papel de la proteína Arc en la remodelación sináptica

La corta temporalidad en que suceden los cambios a nivel metabólico en las neuronas durante la fase tardía del LTP ha hecho sospechar que los IEGs juegan un papel central en la regulación de la actividad sináptica. El principal candidato para explicar estos cambios asociados a la actividad durante la etapa tardía del LTP, es una proteína producto de uno de estos genes de expresión temprana descubierta en 1995 por dos laboratorios de forma independiente: la proteína Arc y que es expresada por el gen Arg3.1 (del inglés activity-regulated gene 3.1)^{55,56}.

La principal característica de esta proteína, es que el ARNm de Arc es inducido únicamente por la actividad sináptica, a diferencia de otros genes de expresión temprana como Zif268 (del inglés zinc finger protein 225)⁵⁵⁻⁵⁷. Además, Arc es rápidamente transportado y acumulado en los sitios de alta actividad sináptica donde es traducido localmente^{57,58}, lo que le permite actuar de forma específica en sinapsis activas. Su descubrimiento a partir de experimentos que involucran alta actividad neuronal, despertó el interés por asociarla a eventos

plásticos que además son dependientes de síntesis proteica, como aquellos desencadenados por el fenómeno de LTP en su fase tardía (I-LTP, del inglés late-LTP)⁵⁹. Así, en el año 2000 Guzowski y col., por primera vez demostraron experimentalmente que Arc juega un papel relevante en la regulación de la fase tardía de la LTP⁵⁸. Ellos observaron que si se inhibe la expresión de la proteína Arc mediante oligonucleótidos antisentido, la LTP tardía se ve afectada, mientras que no se inhibe la fase temprana de la LTP⁶⁰, resaltando así, la posible relevancia de Arc en los procesos de memoria y aprendizaje a largo plazo^{61,62}. A pesar de que la cascada de señalización que involucra la transcripción de Arc no está bien definida, se ha propuesto que Arc se expresa en el núcleo celular rápidamente en respuesta a la actividad sináptica (dependiente de la activación del receptor NMDA y de la cascada de señalización de proteínas cinasas ERK)⁶³. Una vez transcrito el ARNm de Arc este es exportado desde el núcleo al citoplasma y viaja como ribonucleoproteína a las extremidades más distales de las dendritas, acumulándose cerca de las espinas dendríticas donde la sinapsis ha sido activada. Esto es dependiente de la polimerización de actina y la señalización a través de NMDA y Rho cinasa⁶⁴. Así mismo, se ha demostrado que Arc juega un papel regulatorio en el tráfico de los receptores AMPA vía su interacción con dos proteínas de la maquinaria endocítica ya que juegan un papel importante en la endocitosis sináptica: dinamina y endofilina⁶⁵. También ha sido implicada en la modulación de la morfología de la espina dendrítica

regulando el tamaño y tipo de espina⁶⁴. Todas estas acciones intervienen en la modulación de la fuerza sináptica⁶⁶.

Recientemente en el año 2012, Okuno y col., han descrito elegantemente el papel de Arc para silenciar ciertas sinapsis y mantener la homeostasis sináptica alternando los estados activo e inactivo de las espinas dendríticas con la intención de evitar una citotoxicidad por la acumulación de Ca^{2+} durante la fase tardía del fenómeno de LTP (Figura 6)⁶⁷. Esto es, que el papel de la plasticidad de las espinas dendríticas evita efectos citotóxicos en la neurona al aislar los efectos de una elevada concentración de Ca^{2+} al interior celular y al mismo tiempo producir un contraste entre las espinas recién activadas y aquellas que ya han sido silenciadas debido a su historial de actividad previo; de esta manera, se puede mantener una recepción prolongada de la señal sin que se genere una respuesta nociva para la neurona.

La expresión de Arc es altamente regulada en muchos niveles, incluyendo transcripción, degradación del ARNm, traducción y degradación de proteínas. Esto sugiere que la ruptura de la expresión de Arc puede tener profundos efectos en la plasticidad sináptica. Su desregulación al alza y a la baja ha sido implicada en diversas enfermedades neurodegenerativas entre ellas, la enfermedad de Alzheimer y el Síndrome de Angelman^{59,68}.

El interés del presente trabajo consiste en investigar los cambios de expresión de la proteína Arc durante la inducción de la fase tardía del LTP químico con

un análogo permeable del AMPc, el 8-Br-AMPc. Así como los cambios electrofisiológicos de neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo durante la perfusión del 8-Br-AMPc y las modificaciones en la citoarquitectura de las espinas dendríticas.

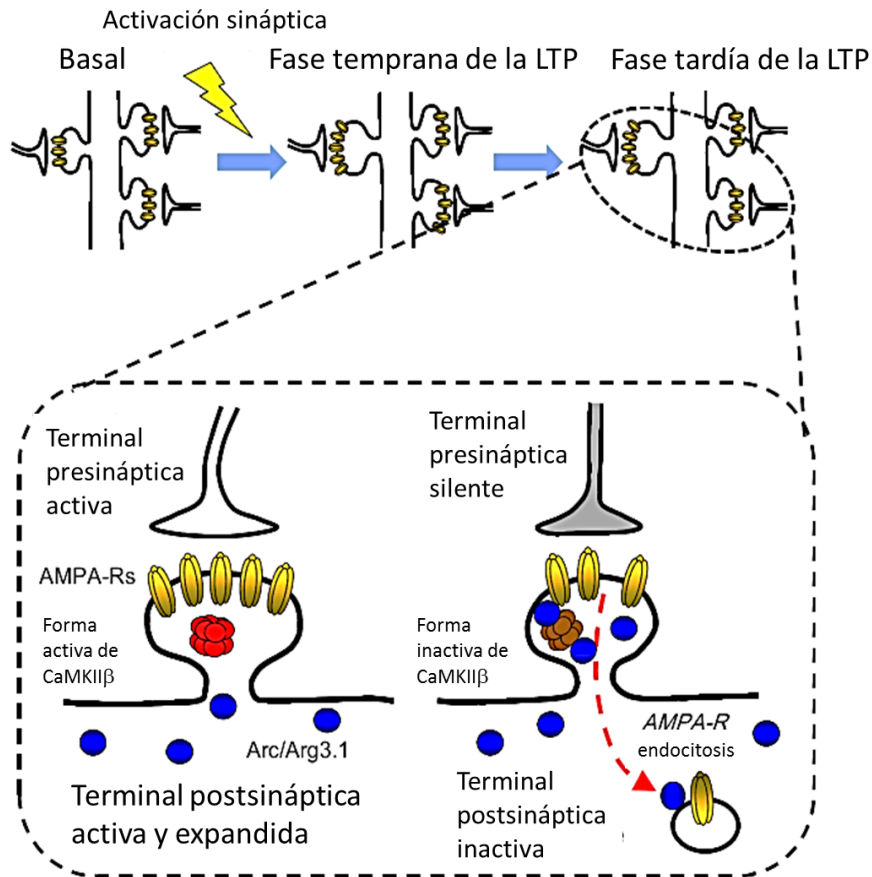


Figura 6. *La proteína Arc mantiene la homeostasis sináptica.* Después de un periodo de alta actividad como la fase tardía del LTP el número de receptores en la densidad postsináptica ha aumentado, mientras que la proteína Arc se acumula en la base de la espina dendrítica. Una vez que la actividad disminuye, Arc y CaMKII- β interaccionan y favorecen la endocitosis de los AMPAR conduciendo a una inactivación de la espina dendrítica. Esta inactivación favorece que se establezca un contraste entre las espinas activas y las inactivas al mismo tiempo que evita un efecto citotóxico debido a la acumulación de Ca^{2+} permitiendo así el establecimiento de la LTP. Modificada de Okuno et al., 2012.

II. Hipótesis

La inducción química de la fase tardía de la potenciación a largo plazo (LTP) favorece la expresión de proteína Arc y modifica el número y tipo de espinas dendríticas en neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo de rata.

III. Objetivos

Objetivo general

- ▶ Demostrar que la LTP química modifica la expresión de Arc en neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo de rata.

Objetivos particulares

- ▶ Estudiar los efectos electrofisiológicos de la incubación con 8-Br-AMPC en neuronas piramidales de CA1.
- ▶ Con inmunofluorescencia, determinar la presencia de Arc en neuronas piramidales de CA1 en condiciones basales y después de la incubación con 8-Br-AMPC.
- ▶ Mediante electrotransferencia (Western blot), determinar los cambios en la expresión de Arc en el hipocampo de la rata, en condiciones control y posterior a la incubación con 8-Br-AMPC.
- ▶ Evaluar con microscopia confocal las modificaciones en la citoarquitectura de las espinas dendríticas en neuronas piramidales de CA1 en condiciones basales y después de la incubación con 8-Br-AMPC.

IV. Materiales y métodos

Animales

Se emplearon ratas Wistar de 14 días postnatales (Protocolo 0121-3) de la UPEAL, CINVESTAV-IPN mantenidas a temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) y sometidas a un ciclo de luz-obscuridad de 12 horas. Los suministros de agua y alimento fueron *ad libitum*.

Obtención de rebanadas de cerebro

Las ratas fueron sacrificadas por decapitación de acuerdo a los estándares internacionales y al protocolo de ética y manejo de animales del CINVESTAV. El cerebro extraído se rebanó mediante cortes coronales de $250\ \mu\text{m}$ de espesor en un vibratomo (WPI, inc. Sarasota, Florida). Durante el procedimiento se mantuvo inmerso el cerebro de la rata en una solución que contenía (en mM): 220 Sacarosa, 2.5 KCl, 1.25 NaH_2PO_4 , 2 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 25 NaHCO_3 , 10 dextrosa, 2.5 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y equilibrada con 95% O_2 y 5% CO_2 (pH 7.3–7.4) a $-5\ ^{\circ}\text{C}$. Inmediato a la obtención, se colocaron las rebanadas en una solución fisiológica que contenía (en mM): 119 NaCl, 2.5 KCl, 2.5 CaCl_2 , 1.0 MgSO_4 , 1.0 NaH_2PO_4 , 26.2 NaHCO_3 , 10 glucosa, y equilibrada con 95% O_2 y 5% CO_2 (pH 7.3–7.4) para su estabilización, durante una hora a temperatura ambiente hasta su uso para los diferentes protocolos experimentales.

Registros electrofisiológicos

Para evaluar electrofisiológicamente el efecto del 8-Br-AMPC en la actividad eléctrica de las neuronas piramidales del *stratum pyramidale* de la región CA1 del hipocampo, después de adquirir los registros control, se perfundió la rebanada con 8-Br-AMPC (Sigma-Aldrich) a una concentración de 100 μ M en solución de registro que contenía (en mM): 119 NaCl, 2.5 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.0 MgSO₄, 1.0 NaH₂PO₄, 26.2 NaHCO₃, 10 glucosa, y equilibrada con 95% O₂ y 5% CO₂ (pH 7.3–7.4), durante 60 minutos y a temperatura ambiente. Se adquirieron registros en condición de fijación de corriente cada 15 minutos con la técnica de patch-clamp en la configuración de célula completa. Para ello, se emplearon pipetas de borosilicato (Sutter Instruments, Novato, CA) con resistencias de entre 5 y 10 M Ω que fueron llenadas con solución interna que contenía (en mM): 130 gluconato de potasio, 5 NaCl, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 0.02 EGTA. Los registros electrofisiológicos se realizaron con un amplificador Axopatch 200B (Axon Instruments, Union City, CA) bajo control visual con un microscopio de fluorescencia Leica DM6500 (Leica Microsystem, Germany) y adquiridos en un ordenador mediante un convertidor analógico digital DigiData 1200 en el software AxoTape 2.0.2 (Axon Instruments). En todos los experimentos, una vez establecida la configuración, se compensó electrónicamente la capacitancia y la resistencia en serie (80%). Las señales se filtraron a 5 kHz con un filtro pasabajos tipo Bessel. Se inyectaron pulsos de corriente a través de la unidad de aislamiento de un estimulador Grass S88,

(Grass Instruments, Quincy, MA). Solamente se consideraron registros de células que presentaban potenciales de membrana en reposo de -60 mV a -55 mV.

Para identificar la morfología neuronal y evaluar los cambios inducidos por el 8-Br-AMPC en las espinas dendríticas, las neuronas registradas se marcaron con Amarillo lucifer (LY; Molecular Probes, Carlsbad, CA). Para este fin, las pipetas de registro fueron llenadas con solución interna más el fluoróforo disuelto al 2.5% en LiCl (Sigma-Aldrich) y se permitió la libre difusión durante el registro electrofisiológico, al finalizar éste, se retiró la pipeta con mucho cuidado y se perfundió la preparación durante 15 minutos para asegurar un buen llenado de las arborizaciones. Posteriormente, las rebanadas fueron fijadas en paraformaldehído al 4% (PFA, 4%, pH 7.4) durante cuatro horas. Posteriormente, se lavó el fijador con PBS con tres recambios sucesivos cada 10 minutos. Finalmente se colocaron las rebanadas en portaobjetos con Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA) como medio de montaje para la obtención de imágenes de microscopia confocal.

Identificación morfológica de las espinas dendríticas

Para la cuantificación de las espinas dendríticas, se seleccionó una dendrita apical lo más recta posible con longitud mínima de 50 μm . Las imágenes de la dendrita seleccionada fueron tomadas con un objetivo de 63X/oil a una longitud de onda de 490 nm. Los parámetros de adquisición fueron: pinhole de

1, velocidad de 400 Hz con un promedio de 4 imágenes por captura. Para las imágenes en 3D, se tomaron 12 planos en Z a intervalos de 0.5 μm y se realizó una proyección en un solo plano (XY). Para el conteo de las espinas, se adquirieron 6 imágenes por grupo (tratadas y no tratadas) en las dendritas de la región apical a partir de la tercera ramificación, entre 100 y 200 μm a partir del soma y de manera aleatoria. Para la cuantificación, se utilizó el software ImageJ (National Institutes of Health) mediante el plugin neuronJ. Se dividió a las espinas en 4 grupos: regordeta, filopodio, delgada y hongo¹⁶. Las espinas con una relación entre el cuello y diámetro de la cabeza mayor a 1, se consideraron tipo hongo. Espinas con una relación cabeza-cuello menor a 1, se consideraron delgadas, mientras que aquellas con una longitud de cuello mayor o igual a 3 μm y sin distinción de cabeza, fueron consideradas filopodio. El resto fue considerado regordeta.

Inmunofluorescencia de la proteína Arc

Para evaluar el efecto del 8-Br-AMPC en la expresión de la proteína Arc por inmunofluorescencia, rebanadas hipocampales ya estabilizadas se incubaron durante 30 y 60 minutos con el 8-Br-AMPC (100 μM) disuelto en solución de registro a temperatura ambiente. El grupo control no fue expuesto al 8-Br-AMPC, pero se mantuvo en las mismas condiciones. Las rebanadas se fijaron en PFA al 4% durante 24 horas a 4 °C. Luego, se lavó el fijador con PBS en tres lavados sucesivos de 10 minutos cada uno. Después las rebanadas

fueron colocadas en PBS con sacarosa 30% como crio-protección durante 24 horas. Posteriormente, fueron adelgazadas en un micrótopo de deslizamiento (Leica SM2010R) a un espesor de 50 μm y colocadas en portaobjetos tratados con 3-aminopropiltriétoxissilano (Sigma-Aldrich). Los portaobjetos se prepararon previamente sumergidos en acetona durante dos minutos para su limpieza. Luego se dejaron secar al aire y se sumergieron durante dos minutos en solución para silanizar que contiene (en ml): 98 de acetona y 2 de 3-aminopropiltriétoxissilano. A continuación, se lavaron dos veces durante dos minutos en agua destilada.

La inmunofluorescencia se realizó de acuerdo al protocolo reportado por Cárdenas-Aguayo y col., (2013)⁶⁹. De forma breve, la permeabilización se realizó incubando los cortes con 20 μL de tritón X-100 al 0.2% en PBS durante 30 min en agitación. El bloqueo de las uniones inespecíficas de los anticuerpos, se llevó a cabo incubando los cortes con 20 μL de BSA 1% en PBS-tritón 0.2% durante 40 min, seguido de la incubación con los anticuerpos primarios conejo policlonal anti *Arg3.1* (Abcam, Cambridge, MA) 1:150 y ratón monoclonal anti β -III tubulina (Promega, Madison, WI) 1:400 en PBS-Tritón 0.2%. Se almacenó todo en una cámara húmeda durante toda la noche a 4C°. Al día siguiente, se decantó la mezcla de los anticuerpos y se lavaron los cortes 3 veces por 10 min cada una con 20 μL PBS-Tritón 0.2% en agitación. Para la aplicación de los anticuerpos secundarios, se incubaron los cortes con 20 μL de la mezcla de anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromos de

diferente rango de excitación/emisión, Alexa 594 anti conejo 1:500 y Alexa 488 anti ratón 1:500 (Molecular Probes) en PBS-Tritón 0.2% durante 1h en cámara húmeda a temperatura ambiente protegidos de la luz. Se decantó la mezcla de anticuerpos secundarios y se lavó con PBS-Tritón 0.2% 3 veces por 10 min. Se incubaron los cortes con Sudan Black (Sigma-Aldrich) 0.3% en etanol al 70%, para eliminar la autofluorescencia (en tejidos por el alto contenido en lípidos) durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron los cortes con 20 μ L de etanol 70% durante 3 min. Se lavaron 3 veces los cortes con 20 μ L de PBS durante 5 min en agitación. Finalmente, se incuban los cortes con 20 μ L de DAPI (4', 6-diamino-2-fenilindol; Sigma-Aldrich) disuelto 10 μ g/ml en PBS, para contrateñir los núcleos de las células, durante 10 minutos a temperatura ambiente en agitación. Después se lavaron los cortes 2 veces con 20 μ L de PBS en agitación.

Análisis de Inmunofluorescencia para Arc

Para analizar la presencia de Arc en la capa piramidal del hipocampo, se utilizó un microscopio confocal Leica TCS SP8 (Leica Microsystem) con un objetivo de 40X. Una vez seleccionada la región de interés (*stratum pyramidale*) se promediaron 8 barridos por captura (line average) y se adquirieron 3 imágenes por grupo a una velocidad de 400 Hz y un tamaño de imagen de 1264 por 1264 pixeles. El Alexa 594 se observó a una longitud de onda de 552 nm y Alexa 488 a una longitud de onda de 488 nm; para la detección del DAPI, se empleó

la longitud de onda en UV de 358 nm. El análisis se realizó mediante un conteo de los píxeles en el *stratum pyramidale* con el software LAS AF (Leica Microsystem).

Determinación de Arc mediante la técnica de Western blot

Para determinar la presencia de Arc mediante Western blot, las rebanadas fueron tratadas como se describe en la sección de inmunofluorescencia de la proteína Arc. Al término de la incubación, las rebanadas se colocaron sobre un papel aluminio en hielo seco y se almacenaron a -70 °C para posteriormente extraer la proteína total. De acuerdo al procedimiento descrito por Cárdenas-Aguayo y col., (2013)⁶⁹, las rebanadas congeladas fueron homogenizadas mecánicamente en buffer de homogenización al 1% (RIPA, Sigma-Aldrich). Luego, se cargaron 10 µg de proteína a partir del homogenizado en un gel de poliacrilamida al 10% y se corrió por 2 horas a un voltaje constante (100 V). La transferencia se realizó en una membrana de nitrocelulosa con un buffer de transferencia que consistió de (en mM): 25 mM Tris, 192 mM Glicina y 20% Metanol, pH 8.4. Se corrió durante toda la noche a una corriente constante de 100 mA. Después de la transferencia se dejó secar la membrana a temperatura ambiente y se marcó con un lápiz la información correspondiente a la membrana. Para analizar la integridad de las muestras, se tiñó con una solución de rojo de Ponceau (Sigma-Aldrich) por un minuto. Posteriormente se

lavó la membrana con agua Milli-Q® (Millipore, Billerica, MA) hasta que las bandas fueron visibles sin mucho fondo.

Para agregar los anticuerpos, se bloqueó durante 90 minutos a temperatura ambiente en agitación con leche (Biorad, Hercules, CA) al 5% en TBST. Al finalizar este tiempo, se adicionó el anticuerpo primario conejo anti *Arg3.1* (Abcam, Cambridge, MA), preparado en TBST con azida de sodio 0.02% y leche al 5% en una dilución 1:2000. Se dejó toda la noche a 4 °C en agitación. Al día siguiente, se recuperó el anticuerpo y se lavó la membrana con TBST tres veces durante 10 minutos y se añadió el anticuerpo secundario cabra anti-conejo conjugado en una dilución 1:5000. Se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente y se lavó con TBST tres veces durante 10 minutos cada vez. Para evidenciar las marcas fluorescentes, se trató la membrana con el método de incremento de luminiscencia o ECL (del inglés Enhanced Chemiluminescence) (Millipore) durante 30 segundos y revelada en el lector de placas ChemiDoc™ MP Imaging System (Biorad) para obtener una imagen digital. La imagen digitalizada se analizó para densitometría mediante el software Image Lab (Biorad).

Análisis estadístico

Para analizar los resultados estadísticamente, se utilizó el software GraphPad Prism versión 5.01 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). El análisis de los cambios morfológicos de las espinas dendríticas se realizó mediante una ANOVA de dos vías seguido de una prueba post hoc de Bonferroni ($p < 0.05$). Para analizar la expresión de la proteína Arc en el WB y la IF, se empleó una ANOVA de una vía seguido de un análisis post hoc de comparación múltiple de Dunnett ($p < 0.05$).

V. Resultados

Efecto del 8-Br-AMPC en la actividad eléctrica de las neuronas piramidales del stratum pyramidale de la región CA1 del hipocampo

Con ayuda del Atlas Paxinos⁷⁰ se identificó la región de interés, de tal manera que se facilitara el marcaje celular. La Figura 7, muestra en panel A, la localización del *stratum pyramidale* en la región CA1 del hipocampo en una rebanada de cerebro de rata marcada con violeta de cresilo a partir de un corte coronal de 250 μm . En B, se muestra una imagen tomada con el microscopio utilizado para los registros electrofisiológicos, con un objetivo de 20X. En esta región se localizan los cuerpos celulares que fueron registrados electrofisiológicamente y teñidos intracelularmente con LY. Siempre se procuró registrar de neuronas cuyo soma se estuviera localizado a 50 μm de profundidad, tratando de asegurar que sus arborizaciones dendríticas se mantuvieron lo más íntegras posible. Una vez que se localizó a la neurona de interés, bajo observación microscópica, se bajó una micropipeta de registro con presión positiva, para remover mecánicamente los detritos celulares de la superficie de la rebanada y la punta de posicionó suavemente sobre el cuerpo celular, al quitar la presión positiva se formó un sello de baja resistencia y aplicando ahora una leve presión negativa a la pipeta se formó un sello de alta resistencia (del orden de los gigaohmios), aplicando a continuación un pulso breve de presión negativa, se perforó la membrana, estableciendo la

configuración de célula completa. En estas condiciones y en el modo de fijación de corriente se registró el potencial de membrana en reposo de 6 células obteniendo un valor promedio de -60 ± 3 mV.

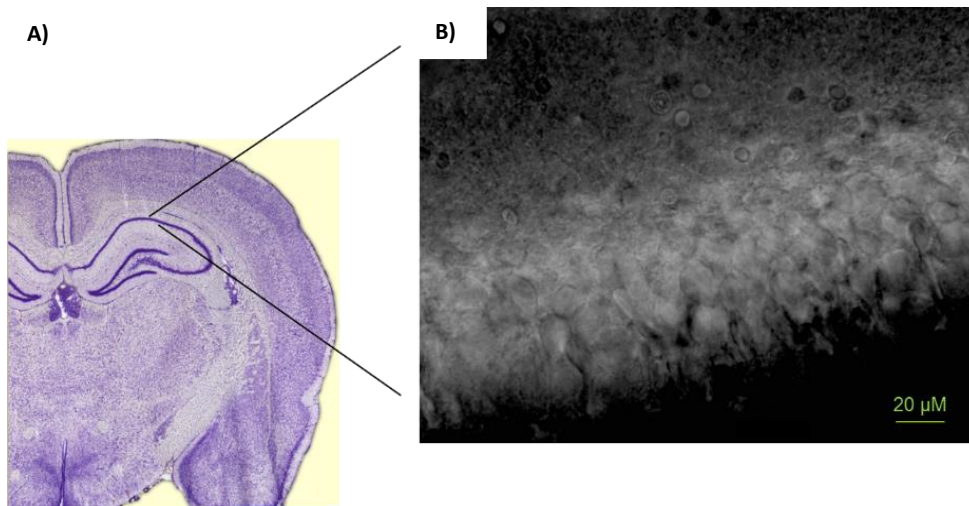


Figura 7. *Localización e identificación de las neuronas del stratum pyramidale*. En A, se muestra una imagen proveniente del Atlas de Paxinos donde se ilustra un corte coronal del cerebro de rata. Se aprecia en tono más oscuro en la zona hipocámpal, los somas correspondientes a las neuronas de la región CA1. En B, se muestra una imagen obtenida por el autor en un microscopio Leica DM6500 (Leica microsystem) donde se aprecian los somas de las neuronas piramidales en empalizada.

La Figura 8D muestra un registro representativo de potenciales de acción espontáneos registrados durante el marcaje con LY. La actividad eléctrica observada es característica de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo^{71,72}. Como puede verse en las fotografías (Fig. 8A-D), después de 15 minutos de mantener la configuración de célula completa, el cuerpo neuronal y las dendritas proximales contienen el fluoróforo LY. A continuación,

la pipeta fue retirada cuidadosamente y se permitió la libre difusión del LY durante 10 minutos manteniendo la perfusión de la cámara de registro con solución fisiológica. Al finalizar el tiempo de incubación, se retiró la rebanada y se colocó en PFA 4% durante 4 horas para fijarla y posteriormente se lavó con PBS con tres lavados sucesivos de 10 minutos cada uno, para después ser almacenada hasta el análisis de la imagen.

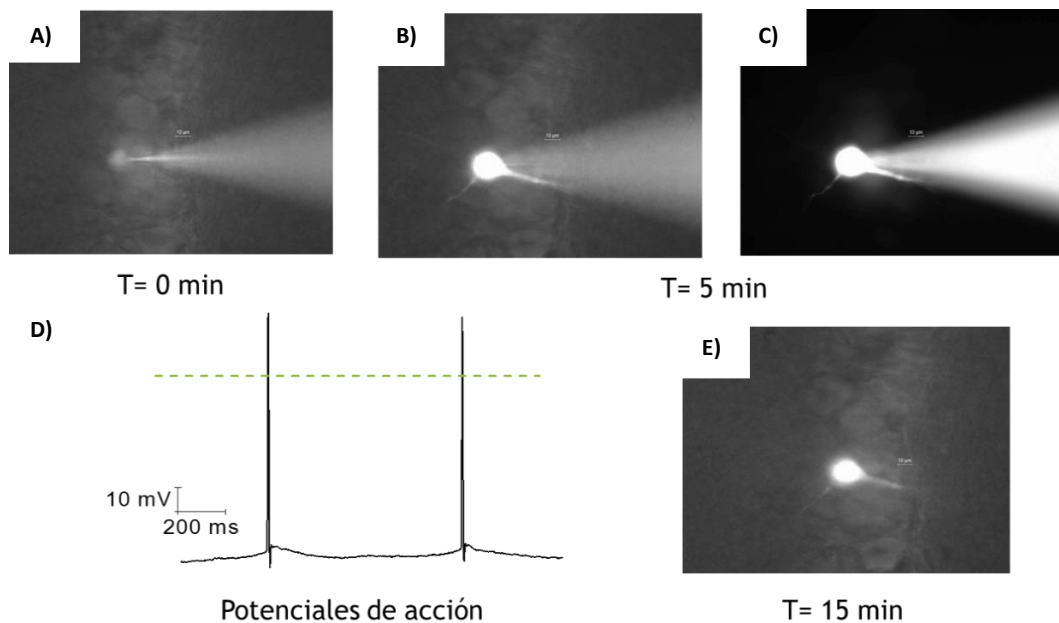


Figura 8. Imagen representativa del procedimiento marcaje de una neurona principal del *stratum pyramidale* con LY. En A-E se muestra el proceso de llenado durante 15 minutos. Se aprecia la pipeta con la que fueron llenadas. En D se presentan los potenciales de acción registrados durante la evaluación electrofisiológica. La línea punteada representa 0 mV.

Registramos la actividad eléctrica evocada por inyección de corriente en tres células que tenían potenciales de membrana en reposo de -55 mV, realizando curvas corriente/voltaje con la finalidad de establecer que en 60 minutos no hubiera cambios importantes ni en el potencial de membrana ni en la resistencia de entrada. Este protocolo además de indicarnos el buen estado de las neuronas, nos sirvió como control para comparar con las células de rebanadas perfundidas con el 8-Br-AMPC también durante 60 minutos. La Figura 9 muestra trazos representativos de una célula control durante la inyección de corriente hiperpolarizante y despolarizante. Nótese que el potencial de membrana en reposo no cambió, que las deflexiones hiperpolarizantes son similares y el número de potenciales de evocados por la despolarización fue el mismo.

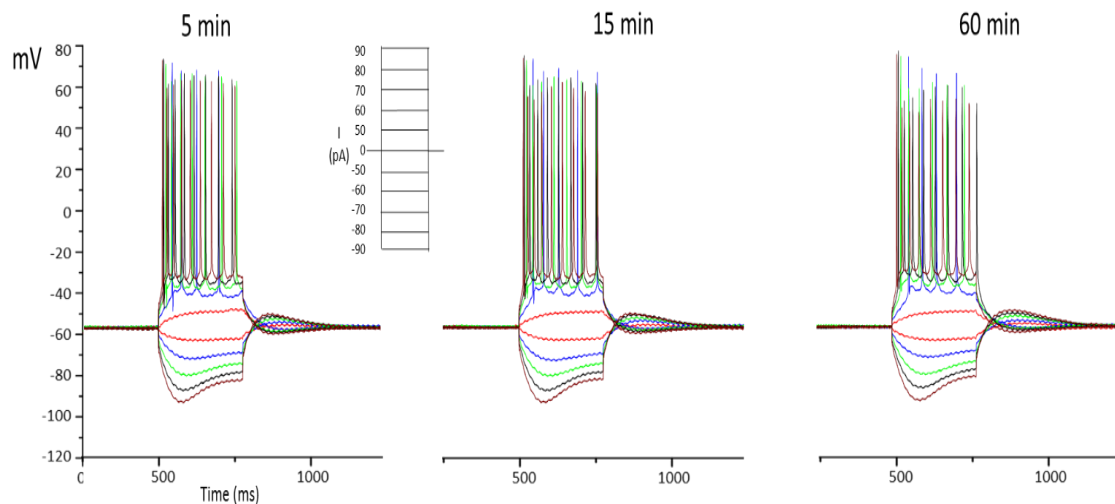


Figura 9. *Propiedades electrofisiológicas de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo.* La inyección de corriente despolarizante a partir del potencial de membrana en reposo evoca disparo repetitivo de potenciales de acción cuya frecuencia aumenta a medida que aumenta la despolarización. La inyección de corriente hiperpolarizante activa la corriente *I_h* mediada por canales HCN1 (potassium/sodium hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 1). El inserto muestra el protocolo de pulsos de -90 pA a 90 pA.

La resistencia de entrada se calculó de la región lineal de las curvas I - V determinadas al final de los trazos de voltaje. La Figura 10 muestra que la resistencia de entrada no se modificó en 60 minutos de registro, y la perfusión de la rebanada con 8-Br-AMPC no modificó de manera significativa dicho parámetro.

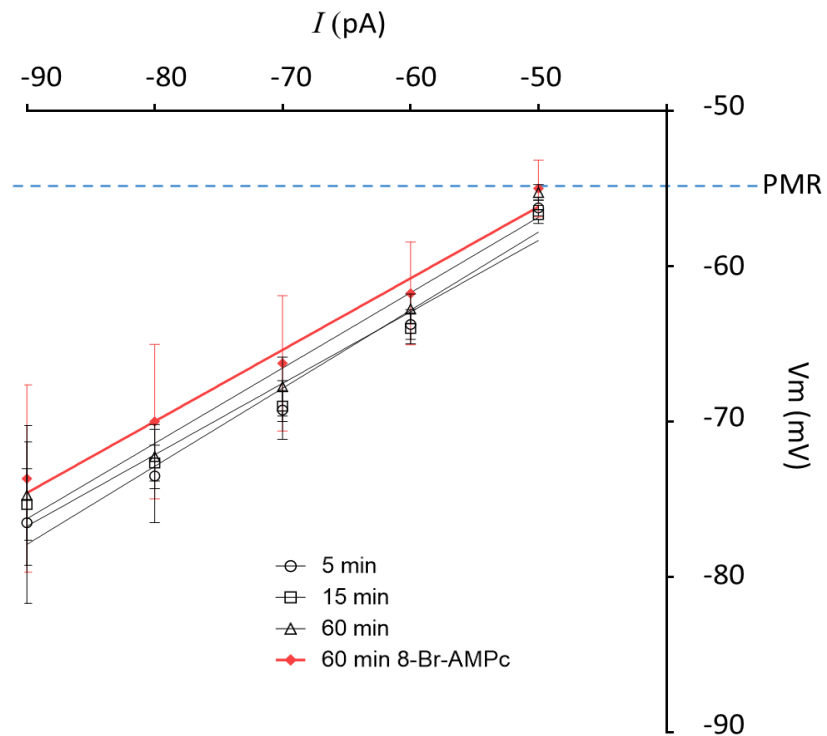


Figura 10. *Curvas corriente-voltaje de neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo.* Los símbolos abiertos corresponden a los valores promedio de 5 células control, las curvas I - V se obtuvieron a los tiempos señalados y se ajustaron a rectas que tienen una pendiente común de 0.48 ± 0.04 que corresponde a una resistencia de entrada de $266 \pm 10 \text{ M}\Omega$ (ajustes en negro). La curva en rojo corresponde al promedio de 4 células que fueron perfundidas con el 8-Br-AMPC y cuyos registros se obtuvieron a los 60 minutos de exposición.

La Figura 11 muestra registros representativos de una neurona expuesta durante 60 minutos al 8-Br-AMPC, y como puede notarse no hay cambios significativos con respecto a los registros control (ver Fig. 9).

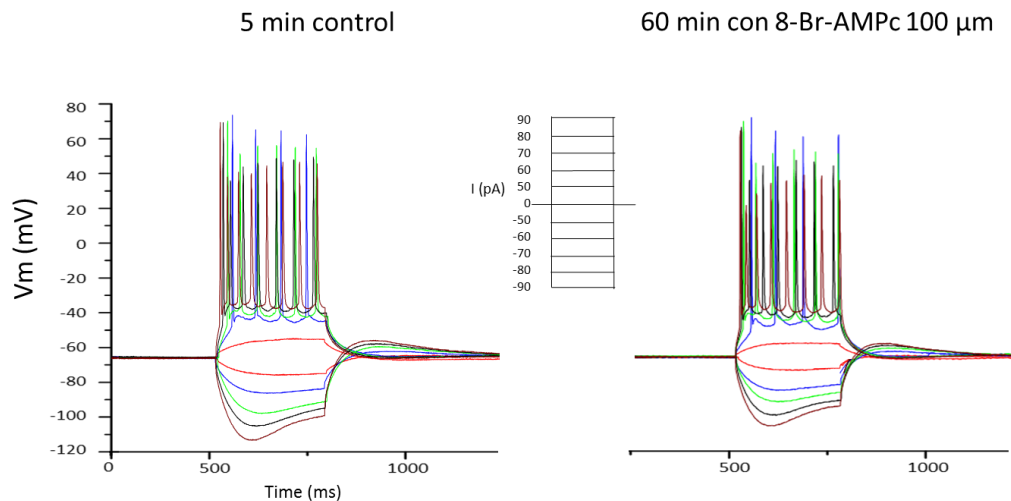


Figura 11. El 8-Br-AMPC no afecta las propiedades electrofisiológicas de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo después de 60 minutos de perfusión.

Efecto de la incubación con 8-Br-AMPC en la morfología de las espinas dendríticas de neuronas piramidales del hipocampo de rata

Tomando en cuenta reportes previos cuyos resultados indican que durante en el establecimiento de la LTP tardía suceden cambios morfológicos en las espinas dendríticas⁶¹ y que en este fenómeno la acumulación de AMPc juega un papel central⁷³, se esperaba que la presencia del 8-Br-AMPC produjera un efecto en la morfología de las espinas. Para la evaluación de dichos cambios

morfológicos se analizaron las dendritas de las neuronas piramidales marcadas con LY mediante microscopia confocal. En la Figura 12, se muestran imágenes representativas de dos dendritas distales provenientes de neuronas piramidales, sin el tratamiento y después de 60 minutos de incubación con el 8-Br-AMPC. A partir de las imágenes obtenidas para cada neurona marcada, se realizó una cuantificación de las espinas dendríticas con el programa semi-automatizado de imageJ y con ayuda del plug-In NeuroJ. Se realizó un análisis en el que se cuantificaron seis neuronas control y seis tratadas de acuerdo a los parámetros establecidos en la sección de Materiales y Métodos.

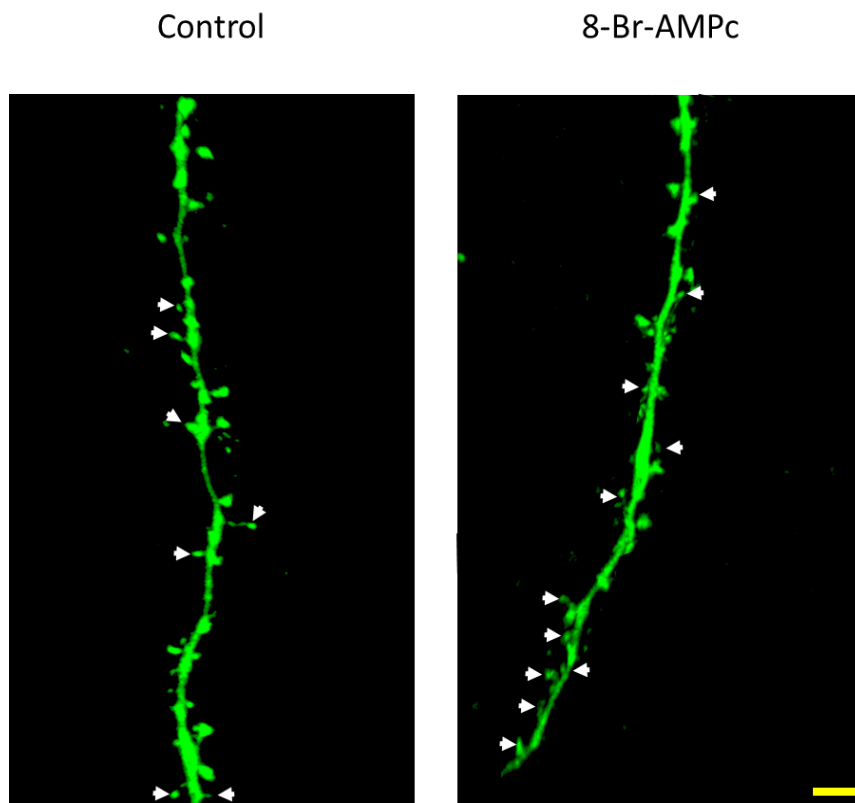


Figura 12. Imágenes de microscopia confocal de dendritas de neuronas de la región CA1 del hipocampo inyectadas con LY. La incubación con 8-Br-AMPC durante 60 minutos modifica el número de espinas delgadas (señaladas con puntas de flecha). La barra de calibración corresponde a 5 μ m.

La cuantificación de espinas dendríticas se muestra en la Tabla I y el análisis estadístico en la Figura 13. El número de espinas tipo delgada incrementó después de la incubación con el 8-Br-AMPC (**p<0.01). No hubo cambio significativo en el número de espinas dendríticas tipo hongo, filopodio ni regordetas a pesar de que se observa una marcada tendencia de disminución para las de tipo hongo y regordetas y una tendencia de incremento en las de tipo filopodio.

Control						
No. Dendrita	1	2	3	4	5	6
Hongo	10	12	9	10	8	13
Regordetas	6	9	7	5	6	9
Delgadas	8	11	12	9	8	7
Filopodio	3	5	4	5	4	3
Perfusión con 8-Br-AMPC durante 60 minutos						
Hongo	9	10	9	10	8	11
Regordetas	6	7	6	4	6	9
Delgadas	8	13	15	11	12	12
Filopodio	3	7	4	4	8	8

Tabla I. Número de espinas dendríticas por dendrita en neuronas piramidales en condiciones control y tratadas con 8-Br-AMPC

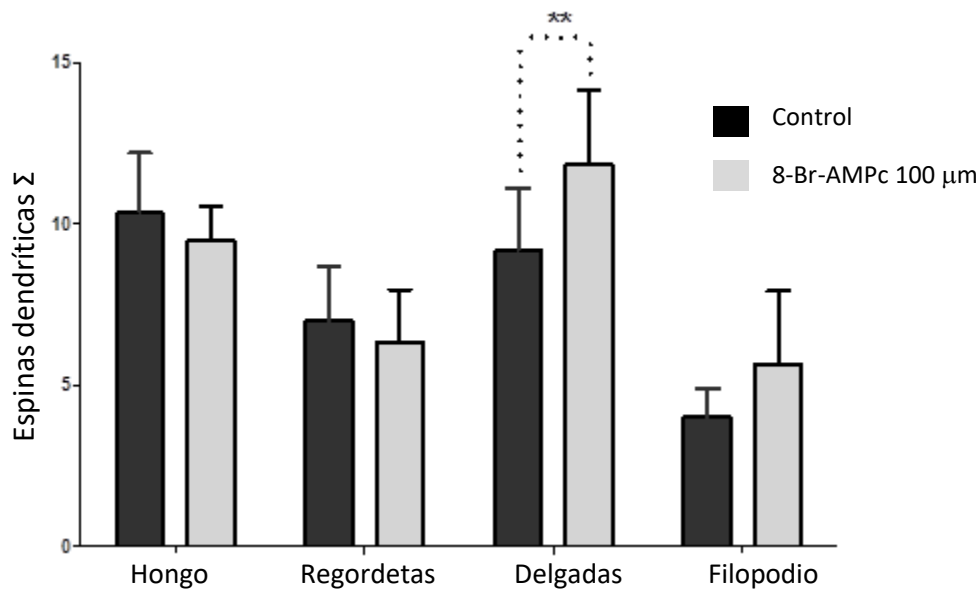


Figura 13. Cuantificación del tipo de espinas dendríticas en rebanadas hipocampales incubadas con 8-Br-AMPC. Solo se detectaron cambios significativos en las espinas tipo delgadas (** p<0.01) de acuerdo a la prueba de ANOVA de dos vías y un análisis post hoc de Bonferroni.

Efecto de la incubación con 8-Br-AMPC en la expresión de Arc en el hipocampo

La fase tardía de la LTP es dependiente de la síntesis de proteínas y esto a su vez, depende de la acumulación del AMPc al interior celular que funciona como activador de las cascadas de señalización para la síntesis de proteínas. Al ser producto de un IEGs, la proteína Arc tiene una expresión rápida en las primeras fases durante el LTP y modula entonces el establecimiento del LTP en su fase tardía⁷⁴. Para saber si el 8-Br-AMPC tenía un efecto sobre la

cantidad de la proteína Arc, se realizó un WB a partir de un lisado de rebanadas hipocampo de rata de 14 días post-natales de un espesor de 250 μm , en condiciones control, o bien, tratadas con 8-Br-AMPC durante 30 y 60 minutos (Figura 14). La presencia de Arc fue observada como una banda simple con un peso molecular de 55 kDa mientras que el GAPDH (del inglés glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) se localizó a 37 kDa.

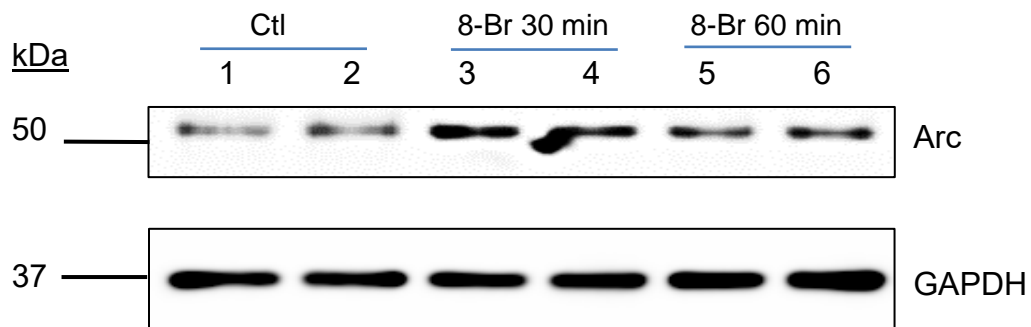


Figura 14. El 8-Br-AMPC modifica la expresión de la proteína Arc en hipocampo de rata. En el carril superior, se muestra el resultado para el Western blot contra la proteína Arc cuyo peso molecular es de 55 KDa. En el carril inferior, se observan las bandas correspondientes para cada condición del GAPDH como control de carga.

El análisis densitométrico de resultados del WB se muestran en la Figura 15. A partir de las bandas obtenidas, se realizó una evaluación de la intensidad de pixeles tomando como control el GAPDH para normalizar los valores obtenidos para cada condición. Se muestra el promedio de tres experimentos, cada uno por duplicado en cada experimento. Como puede notarse, la expresión de la proteína se ve modificada desde los 30 minutos de exposición como un

incremento significativo respecto al control (** $p < 0.01$). La incubación durante 60 minutos, se mantiene significativamente mayor con respecto al control, pero en menor medida que a los 30 minutos de incubación (* $p < 0.05$). No se observó diferencia significativa entre los 30 y 60 minutos de incubación.

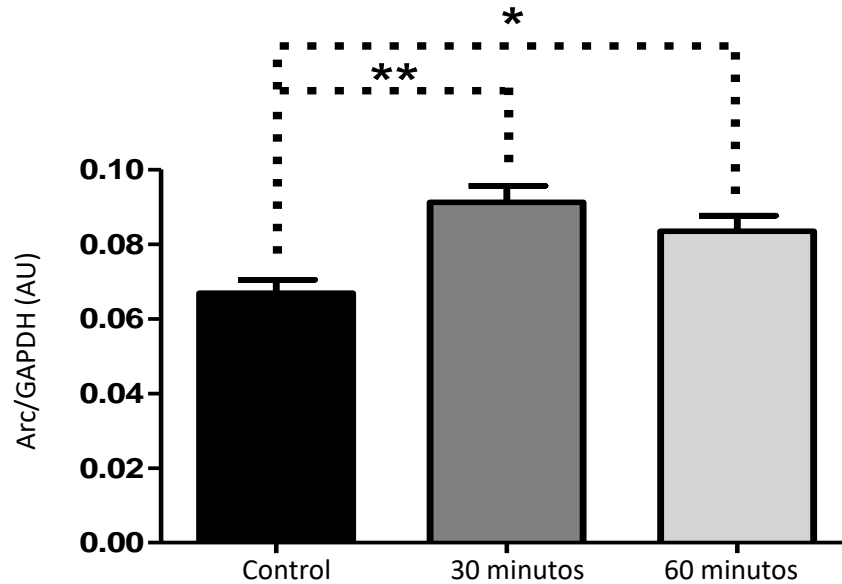


Figura 15. Densitometría del efecto del 8-Br-AMPC en la expresión de la proteína Arc. Las bandas resultantes en el WB, se analizaron por intensidad de píxeles. Se observa diferencia significativa para ambos tratamientos respecto al control; sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre el tratamiento de 30 minutos respecto al de 60 minutos. De acuerdo al análisis post hoc de comparación múltiple de Dunnett, la significancia estadística fue ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$ en una ANOVA de una vía.

Una vez observado el efecto del 8-Br-AMPC en la expresión de la proteína en rebanadas hipocampales de rata, el siguiente objetivo fue determinar la localización de la proteína en neuronas principales durante la incubación con 8-Br-AMPC. Para esto se realizó la técnica de inmunofluorescencia contra la proteína Arc usando el mismo anticuerpo contra Arg3.1 empleado en los

experimentos de WB. Se utilizó un marcador contra la β -III tubulina, para poder identificar la estructura de las neuronas. En la Figura 16, se muestra una imagen representativa para cada uno de los tiempos de incubación con 8-Br-AMPC (30 y 60 minutos). En el canal azul, se muestra la tinción con DAPI para los núcleos; en el verde, la tinción con Alexa 488 para la β -III tubulina y en el rojo, la tinción con Alexa 592 para Arc. En la columna final se muestra el empalme de los canales. Como se puede observar, la presencia de proteína Arc es mayor a los 60 minutos de incubación con 8-Br-AMPC principalmente en la región somática. No se detectó Arc en las regiones dendríticas del hipocampo.

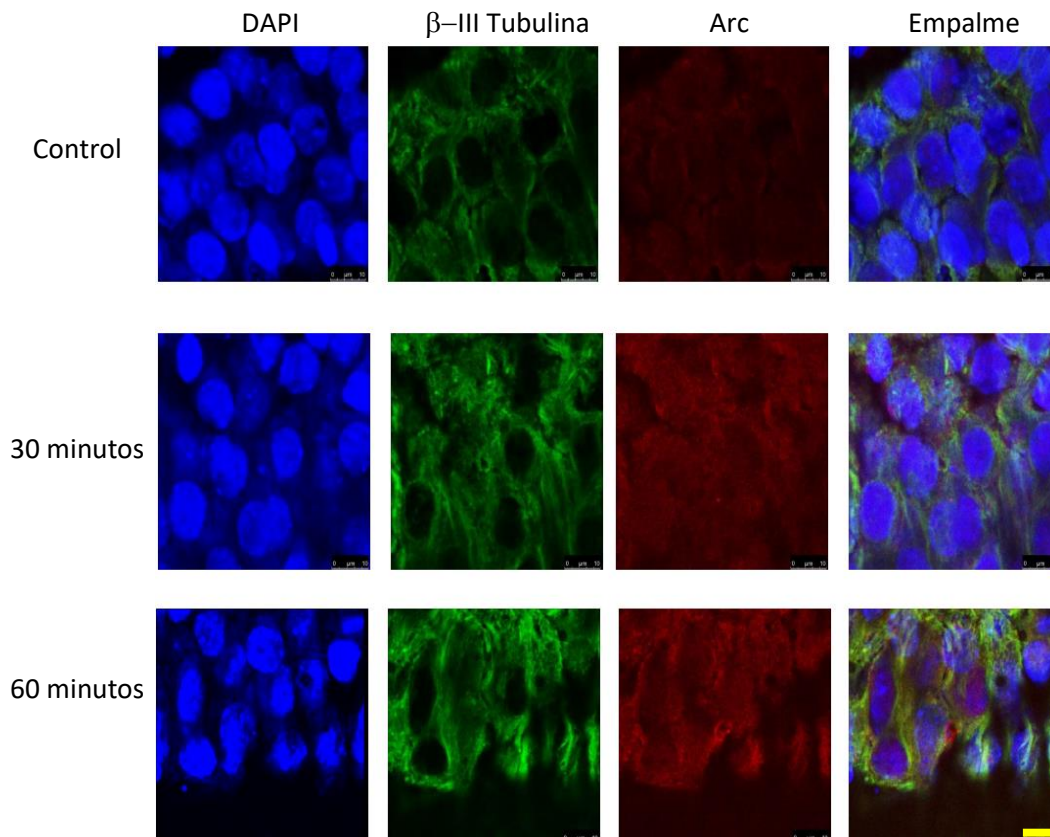


Figura 16. La incubación con 8-Br-AMPC modifica la expresión de Arc a nivel somático. Imagen representativa de los resultados obtenidos en la inmunofluorescencia donde se aprecia (de izquierda a derecha) el DAPI, la β -III tubulina, Arc y el empalme de los tres canales a diferentes tiempos de incubación, desde control hasta 60 minutos. Imagen tomada a 40X con un zoom digital de 2X. La barra de escala en amarillo, representa 10 μ m.

Los análisis cuantitativos muestran una diferencia significativa a los 30 y 60 minutos de incubación con 8-Br-AMPC con respecto al control (30 minutos, $p < 0.001$; 60 minutos, $p < 0.01$) en el *stratum pyramidale* (región somática) manteniéndose los niveles de Arc elevados durante la incubación, no mostrando diferencias entre los 30 y 60 minutos (Figura 17).

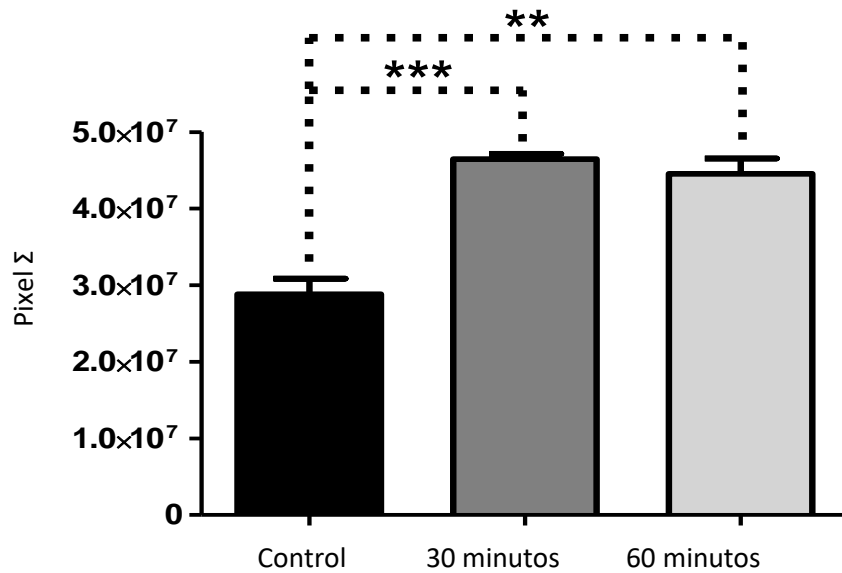


Figura 17. *Efecto del 8-Br-AMPC en la expresión de la proteína Arc en la región somática.* La incubación con 8-Br-AMPC incrementa la expresión de la proteína Arc significativamente a los 30 minutos (***) $p < 0.001$) y este efecto se mantiene a los 60 minutos (** $p < 0.01$). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido de una prueba post hoc de comparación múltiple de Dunnett.

VI. Discusión

Efecto del 8-Br-AMPC en la actividad eléctrica de neuronas piramidales de hipocampo de rata

En condiciones de estimulación neuronal la CaMKII juega un papel importante en el establecimiento de la fase tardía de la LTP y los procesos de memoria a largo plazo. Se sabe que las vías de señalización que incrementan la actividad de la CaMKII pueden ser estimuladas a través del uso de análogos permeables del AMPc como el 8-Br-AMPC^{75,76}. Dadas las modificaciones en la estructura del fármaco, éste es capaz de activar las vías de señalización dependientes del AMPc, sin sufrir el efecto de las fosfodiesterasas, lo que le permite una acción prolongada que contribuye al establecimiento de la fase tardía de la LTP de manera casi inmediata^{41,53}. Se ha demostrado que la inducción química de la fase tardía de la LTP mediante el uso de análogos del AMPc se logra en menos tiempo (15 minutos) y con una mayor eficiencia en comparación con la estimulación eléctrica (2 horas) en ratas adultas^{61,77,78}. Sin embargo, en etapas tempranas del desarrollo (primeras dos semanas postnatales) la expresión de CaMKII es baja e incrementa a partir de la tercera y cuarta semana⁷⁹ (Figura 18), lo que podría ayudar a explicar por qué no se lograron observar cambios en la actividad eléctrica asociados a la activación de la CaMKII (como los EPSPs cuyo incremento es indicador del establecimiento de la LTP) mediante la incubación con el 8-Br-AMPC en

rebanadas hipocampales de rata PN14. Así mismo, se sabe que la calcineurina tiene una gran afinidad por la Ca²⁺/calmodulina y su expresión empieza hasta etapas tardías del desarrollo: es baja en las dos primeras semanas postnatales y gradualmente va incrementándose hasta la cuarta semana (Figura 18).

Por otro lado, en el año 2000 Brown y col., demostraron que el LTP es dependiente de las vías de señalización activadas por AMPc mediante el uso del 8-Br-AMPc y una estimulación eléctrica de manera concomitante, esto, posiblemente debido a la activación de vías paralelas que convergen en el incremento de AMPc y las vías de señalización río abajo⁵³. En su trabajo ponen de manifiesto que la sola activación de la CaMKII por el 8-Br-AMPc no es suficiente para la generación de la LTP y se requiere de un incremento en el inhibidor de las fosfatasa 1 (PP1). Se sabe que las fosfatasa PP1 y PP2A se encuentran en su máximo nivel de expresión desde el nacimiento y disminuye después dos semanas^{80,81}.

En otros trabajos se ha reportado que los protocolos para inducir LTP en tejido de animales recién nacidos, son menos eficientes y las neuronas muestran umbrales mayores para generar LTP⁸². La dosis de 8-Br-AMPc usada en este trabajo, se basó en los reportes de Bolshakov, quien empleando animales adultos logra establecer un LTP continuo a tiempos cortos con un análogo permeable del AMPc⁴¹. Por lo que se sugiere que, para futuras investigaciones, usando el mismo protocolo experimental, se incremente la concentración del 8-Br-AMPc⁷⁶.

Por otra parte, a pesar de que el efecto en la actividad eléctrica no fue el esperado, la incubación con el 8-Br-AMPC mostró un ligero efecto en las propiedades electrofisiológicas al observarse una modificación en el potencial de membrana a valores hiperpolarizantes, sugiriendo una influencia en la corriente generada por canales activados por hiperpolarización operados por nucleótidos cíclicos.

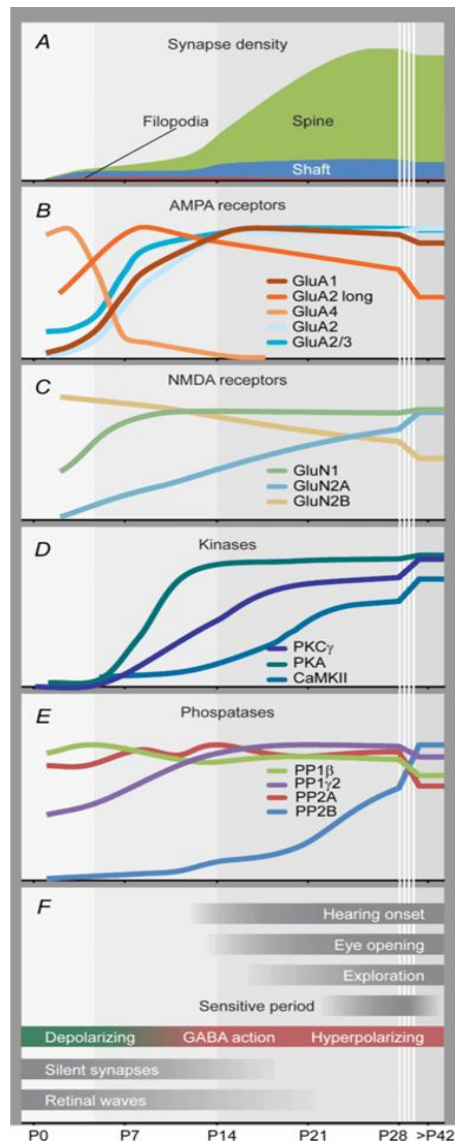


Figura 18. Curso temporal de diversos componentes sinápticos durante el desarrollo. En A), se muestra el curso temporal del desarrollo de las sinapsis. En B-E) se muestran los cambios moleculares que suceden durante el desarrollo de las sinapsis en el hipocampo comparados con las conductas mostradas en el panel F), note que las fosfatasas PP1 y PP2A están en su máxima expresión justo a los 14 días, mientras que la CaMKII tiene una baja expresión. Las curvas en A-E están expresadas en porcentajes de máxima densidad o como un nivel de expresión. Tomado de Lohmann and Kessels,

Al hacer un análisis estadístico de los valores al pico de los potenciales hiperpolarizantes, no se encontraron diferencias significativas entre el fenómeno observado durante la incubación y el control. Sin embargo, la tendencia observada coincide con reportes para los canales HCN de la familia 1 (HCN1) lo que pudiera explicar el comportamiento de la corriente observada^{83,84}. Dichos canales permiten entrada de iones Ca^{2+} lo que favorecería llevar al potencial a valores despolarizantes⁸⁵. Como se muestra en la Figura 10, se observa un desplazamiento de la pendiente a la izquierda durante la incubación con el 8-Br-AMPC que no es debida a un efecto de la temporalidad del registro. La apertura de los HCN1 podría estar asociada entonces, al efecto observado en la disminución de la resistencia de entrada durante la incubación, indicando que, pese a la falta de significancia estadística, el 8-Br-AMPC podría estar ejerciendo un efecto en las vías de señalización río abajo dependientes al AMPC. Sin embargo, un incremento en el número de muestras podría permitir explorar mejor el fenómeno.

Efecto de la incubación con 8-Br-AMPC en la morfología de las espinas dendríticas

Estudios sobre los cambios en la morfología de las espinas dendríticas han descrito la transición en las sinapsis de tallo, para formar espinas regordetas que se transforman en espinas delgadas y finalmente, según el establecimiento de la sinapsis, la formación de una espina tipo hongo¹². Las

espinas filopodio se han descrito como espinas de localización y no parecen ser precursoras; sin embargo, todas las etapas previas a las espinas tipo hongo y delgadas incluyendo las filopodio, son aún tema de discusión ya que su función no está del todo determinada^{20,86,87}.

Se sabe que las espinas tipo hongo son las que están más relacionadas con el establecimiento de la fase tardía de la LTP^{8,88}. Como se discute en el punto anterior, la incubación con 8-Br-AMPC no generó una despolarización ni facilitó la generación de la LTP. Por lo tanto, era poco esperado encontrar algún efecto sobre el tipo de espinas tipo hongo, asociadas a esta potenciación. A pesar de que el 8-Br-AMPC no mostró un efecto significativo en la actividad electrofisiológica, sí se observó un efecto en la morfología de las espinas dendríticas de las neuronas registradas como un incremento en el número de espinas delgadas. Este tipo de espina dendrítica se ha propuesto como una forma previa a las espinas tipo hongo y se encuentra con una gran abundancia en el hipocampo de roedores en etapas juveniles^{61,77,89}. Al mismo tiempo, son los elementos morfológicos con mayor plasticidad^{71,90} lo que supone una mayor tasa de cambio ante estímulos externos. Esto es, la adición de un análogo permeable del AMPc sí logró modificar la estructura de las dendritas, incrementando conexiones sinápticas de corta duración, más no así, la formación de conexiones permanentes y relacionadas con la instauración de la LTP.

Existen reportes donde se indica que las espinas dendríticas pudieran funcionar como compartimentos químicos y eléctricos, de modo que

mantiene aislada su actividad del resto de la dendrita y del cuerpo celular⁹¹⁻⁹³ protegiendo a la neurona de los efectos tóxicos por acumulación de Ca^{2+} y otros metabolitos derivados de altos periodos de actividad. Además, Matsuzaki y col., (2001) reportan que la morfología de las espinas obedece a la distribución de los receptores AMPA en la densidad postsináptica y son las espinas tipo hongo las que mayor distribución de estos receptores poseen, mientras que las de tipo delgada las que menos receptores AMPA presentan, lo que interviene en el desarrollo de su morfología. Como se describió anteriormente, los receptores AMPA están involucrados en las primeras fases de la generación de un potencial de acción, y en el silenciamiento de las sinapsis existentes, principalmente, mediado por la proteína Arc. Los grupos de investigadores liderados por Okuno y Korb^{67,94} proponen que la dinámica en los cambios morfológicos de las espinas dendríticas, dependen de la presencia de Arc para lograr un mantenimiento de la homeostasis sináptica funcionando como un modulador entre el estado activo e inactivo de las espinas dendríticas y evitar así los efectos citotóxicos de las elevadas concentraciones de Ca^{2+} generado durante la actividad sináptica.

Efecto de la incubación con 8-Br-AMPC en la expresión de Arc en el hipocampo

De acuerdo a reportes previos, la proteína Arc estaría jugando un papel importante en la plasticidad de las espinas dendríticas^{59,63,64,67}, ya que se ha

visto relacionada con la actividad de las cinasas (ej. la CaMKII) y de la entrada de Ca^{2+} y acumulación de AMPc^{46,95,96}. A pesar de la baja presencia de la CaMKII en etapas tempranas del desarrollo, la activación de las vías dependientes del AMPc, sobre todo la activación de receptores y canales de membrana que permiten el paso y acumulación de Ca^{2+} intracelular, como los NMDA, AMPA y HCN1, se ha visto relacionada con activación de las vías de señalización que permiten la expresión de la proteína Arc en neuronas de piramidales del hipocampo. Este incremento en la expresión de Arc se ha relacionado con los cambios a nivel morfológico en las espinas dendríticas. Habiendo encontrado que el 8-Br-AMPc ejerce un efecto en la formación de espinas tipo delgadas en las rebanadas de hipocampo de rata de 14 días de edad, se trató de dilucidar el papel que la proteína Arc pudo haber jugado en estas modificaciones.

Mediante la técnica de WB observamos que tras la incubación con 8-Br-AMPc existe un incremento de la proteína Arc en homogenizados de hipocampo incluso 30 minutos postincubación. En la Figura 15 el análisis densitométrico realizado al WB mostró la influencia que tiene el 8-Br-AMPc en la expresión de la proteína como un incremento sostenido a lo largo de la incubación ya que no se observó una diferencia significativa entre los 30 y 60 minutos, lo cual sugiere un incremento sostenido.

Arc es una proteína producto de un IEGs, es decir, su expresión es inmediata ante un estimulación neuronal^{55,56}. Evidencia mostrada en experimentos que emplean Oligodeoxinucleotidos (ODNs) e inhibidores de la síntesis proteica y

más recientemente, con modelos knockout para la proteína ($Arc^{-/-}$), demuestran que la presencia de esta proteína es importante para la inducción de los cambios morfológicos en las espinas dendríticas asociados a la memoria y aprendizaje, así como a los fenómenos de LTP, particularmente de su fase tardía^{64,97-99}. Como se ha discutido anteriormente, bajo nuestro protocolo no logramos observar la inducción de LTP, ni cambios en espinas tipo hongo, mayormente asociadas a procesos de memoria y aprendizaje. Por lo tanto, los niveles de Arc detectados a los 30 y 60 min postincubación, nos indican que el 8-Br-AMPC sí está ejerciendo un efecto en las vías de señalización involucradas en la formación y modificación de las espinas dendríticas, restringiéndose a las espinas delgadas. Waltereit y col., (2001) demostraron que la expresión del gen *Arc/Arg1.3* es estimulada por la adición de AMPC y calcio en cultivos primarios de células hipocampales¹⁰⁰, lo cual apoya los resultados del presente trabajo, pues en ausencia de LTP o potenciación, la incubación con el 8-Br-AMPC sí logró aumentar la cantidad de la proteína Arc, involucrada en la maquinaria post-sináptica y la formación o remoción de espinas dendríticas.

Más aún, se ha podido demostrar que la activación de fosfatidil-inositol-3 quinasa (PI3K) *in vivo* o en cultivos hipocampales de rata permite la formación de nuevas espinas de cabeza pequeña (tipo espinas delgadas), aunado a un incremento de Arc, independientemente de la actividad neuronal¹⁰¹. Más aún, la sobre-expresión de Arc en cultivos hipocampales también aumenta la cantidad de espinas tipo delgadas⁶⁴. Estos reportes apoyan, por tanto, los

resultados del presente trabajo, donde la incubación con el 8-Br-AMPC ocasiona un cambio en la morfología de las espinas dendritas, por espinas de cabeza más pequeña o tipo delgadas, aunado a un incremento en Arc.

Adicional a la cuantificación de la proteína total del hipocampo, se realizó una inmunofluorescencia contra Arc, para poder regionalizar anatómicamente este incremento causado por la incubación con el 8-Br-AMPC.

En rebanadas adelgazadas que fueron incubadas con el análogo del AMPC pudimos detectar la presencia de Arc aún a nivel basal (controles), pero esta se vio aumentada a los 30 min y a los 60 min postincubación con el 8-Br-AMPC, exclusivamente en la región somática de las neuronas piramidales. No se observó la presencia de Arc en las regiones dendríticas del hipocampo bajo ninguna condición experimental.

Como se muestra en la Figura 16, la distribución de Arc es puramente somática. Al respecto, un trabajo reciente hecho por Bloomer y col., (2007) en cuyos resultados describen la existencia de una interacción sinérgica entre Arc y los PML-b (del inglés Promyelocytic leukemia bodies) a través de la variante por splicing β SpIV Σ 5 de la espectrina β IV¹⁰². Una pequeña región de Arc contiene un dominio de interacción con la espectrina que parece funcionar como un sitio de regulación transcripcional para los PML-b, incrementándolos. Los PML-b son producto de un gen supresor de tumores vistos como un puntillero intercalado en la cromatina y cuya expresión es altamente regulada durante el desarrollo celular¹⁰³.

Recientemente se han detectado los PML-b en las neuronas en desarrollo a partir del día 15 post natal como reguladores de transcripción, inductores de apoptosis e inhibidores de proliferación^{103,104}. Por otro lado, se ha visto que junto con Arc, los PML-b funcionan como un regulador de la transcripción de la subunidad GluA1 en neuronas de ratas adultas⁹⁴. La subunidad GluA1 juega un papel importante en la excitabilidad neuronal¹⁰⁵

Así mismo, un hallazgo reciente sugiere que la presencia de Arc en el núcleo es indispensable para interactuar con una subunidad del complejo regulador de la cromatina que funciona como acetiltransferasa de la histona, llamada Tip60. Este complejo ha sido reportado a su vez, como sustrato crucial del inductor de memoria dependiente de la edad llamado H4K12¹⁰⁶. De esta manera Arc estaría funcionando también desde el núcleo como un regulador de la plasticidad sináptica y posiblemente con ello mantienen la homeostasis sináptica. Más aún, incrementos transitorios de Arc han sido relacionados con la estabilización y expansión de la F-actina en las espinas dendríticas, condición fundamental para el engrosamiento morfológico de las sinapsis y el establecimiento del LTP⁶³. Por lo tanto, los resultados aquí mostrados, sugieren que la expresión y traducción de la proteína Arc puede ser estimulada directamente por el 8-Br-AMPC aún sin la generación de LTP, pero esta parece corresponder a una etapa temprana de activación neuronal donde la expresión de la proteína se incrementa solamente en el soma de las neuronas, y no se ve cambio en la cantidad de espinas tipo hongo silenciadas, espinas principalmente relacionadas con la presencia de Arc¹⁰⁷.

Pero ¿Cómo podría el 8-Br-AMPC tener un efecto sobre la expresión de Arc y la modificación de espinas dendríticas? Esto es dado que incrementos en la concentración de AMPC pueden activar la expresión de genes cuyo promotor contenga una o varias secuencias de CREs (del inglés cAMP response elements)¹⁰⁸. La proteína CREB actúa como factor de transcripción al unirse a ciertas secuencias CREs. Trabajos recientes han identificado elementos de respuesta en el promotor del Arc subyacentes a su regulación transcripcional dependiente de la actividad¹⁰⁹. Se identificaron dos elementos de respuesta de suero (SRE) en aproximadamente ~ 0,9 kb y ~ 1,5 kb río arriba del sitio de iniciación de la transcripción (siendo estos elementos prescindibles para la activación transcripcional por el calcio y el AMPC, cercanos a CREB). El promotor de Arc también lleva a cabo una actividad de sensor único llamado el elemento de respuesta sensible a la actividad sináptica (SARE), que se encuentra ~ 7 kb río arriba del sitio de iniciación de la transcripción para Arc¹⁰⁹. Experimentos previos han demostrado que la activación de CREB incrementa los niveles de Arc y mejora los procesos de memoria en ratones transgénicos para la enfermedad de Alzheimer¹¹⁰ y en la reconsolidación contextual en ratones tratados con morfina^{100,111}. Lo que pudiera sugerir que la aplicación directa del 8-Br-AMPC pudo estimular CREB e incrementar la expresión de Arc, y esta a su vez, incrementar la formación de espinas dendríticas tipo delgadas, de manera independiente a la actividad neuronal.

En el presente proyecto no se midió la presencia de CREB, PKA o CAMKII en las neuronas estimuladas, lo cual pudiera esclarecer el mecanismo por el cual

el 8-Br-AMPC logra incrementar a Arc en el soma de neuronas piramidales en esta etapa temprana del desarrollo sin generar una potenciación o un LTP.

VII. Conclusiones

- ▶ La incubación con el 8-Br-AMPC en rebanadas hipocampales de rata de 14 días post-natales generó cambios morfológicos al incrementar el número de espinas tipo delgadas y aumentar la presencia de la proteína Arc.
- ▶ La expresión de la proteína Arc inducida por el 8-Br-AMPC en ratas de 14 días postnatales es sostenida y principalmente somática.
- ▶ La presencia de Arc en el soma y la región perinuclear sugiere un posible papel en la regulación de factores transcripcionales y la homeostasis sináptica.
- ▶ Este es el primer trabajo donde se reporta la expresión somática de Arc endógena inducida químicamente en una etapa de desarrollo neuronal temprana, 14 días postnatales.

VIII. Perspectivas

- ▶ Se propone utilizar el mismo protocolo experimental incrementando la concentración del 8-Br-AMPC para poder observar modificaciones en las propiedades eléctricas de neuronas piramidales de CA1.
- ▶ Se requiere estudiar el efecto del 8-Br-cAMP en rebanadas de rata adulta, para poder dilucidar si los resultados aquí mostrados dependen de una falta de maquinaria sináptica o bien, de otros mecanismos asociados a la excitabilidad neuronal.
- ▶ Estudios subsecuentes deberán abordar la evaluación de las fosfatasas y cinasas asociadas con la actividad de Arc para poder entender el mecanismo por el cual el 8-Br-AMPC modifica la actividad neuronal en esta etapa temprana del desarrollo.

IX. Referencias

1. Aguado-Aguilar, L. Aprendizaje y memoria. *Rev. Neurol.* **32**, 373–381 (2001).
2. Kandel, E. R. *En busca de la memoria: nacimiento de una nueva ciencia de la mente.* (Katz, 2007).
3. López-Muñoz, F., Álamo, C., García-García, P. & Boya, J. Relevancia histórica de la teoría neuronal un siglo después del Nobel de Cajal: implicaciones psiquiátricas y psicofarmacológicas. *Psiquiatr. Biológica* **13**, 167–182 (2006).
4. Albarracín-Teulón, A. La teoría Celular, paradigma de la biología del siglo XIX. *Acta Hisp. ad Med. Sci. Hist. Illus.* **2**, 241–262 (1982).
5. Alberts, B. *et al. Molecular Biology of the cell.* (Garland Science, 2002). at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21054/>>
6. Kandel, E. R., Schwartz, J. & Jessell, T. M. *Principios de neurociencia.* (McGraw-Hill Interamericana de España, 2001).
7. Ramón Y Cajal, S. The structure and connexions of neurons. *Nobel Lect. Physiol. or Med. 1901-1921* 220–253 (1906).
8. Nimchinsky, E. A., Sabatini, B. L. & Svoboda, K. Structure and function of dendritic spines. *Annu. Rev. Physiol.* **64**, 313–353 (2002).
9. Yang, G., Pan, F. & Gan, W. B. Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories. *Nature* **462**, 920–924 (2009).
10. Chklovskii, D. B., Mel, B. W. & Svoboda, K. Cortical rewiring and information storage. *Nature* **431**, 782–788 (2004).
11. Holtmaat, A. & Svoboda, K. Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat. Rev. Neurosci.* **10**, 647–658 (2009).
12. Arellano, J. I., Benavides-Piccione, R., Defelipe, J. & Yuste, R. Ultrastructure of dendritic spines: correlation between synaptic and spine morphologies. *Front. Neurosci.* **1**, 131–143 (2007).
13. Ramón Y Cajal, S. *La textura del sistema nervioso del hombre y los vertebrados.* (Moya, 1899).
14. Bonhoeffer, T. & Yuste, R. Spine Motility : Phenomenology , Mechanisms , and Function. *Neuron* **35**, 1019–1027 (2002).
15. Tackenberg, C., Ghori, A. & Brandt, R. Thin, stubby or mushroom: spine pathology in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* **6**, 261–268 (2009).
16. Peters, A. & Kaiserman-Abramof, I. R. The small pyramidal neuron of the

- rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *Am. J. Anat.* **127**, 321–356 (1970).
17. Papa, M., Bundman, M. C., Greenberger, V. & Segal, M. Morphological analysis of dendritic spine development in primary cultures of hippocampal neurons. *J Neurosci* **15**, 1–11 (1995).
 18. Kasai, H., Fukuda, M., Watanabe, S., Hayashi-Takagi, A. & Noguchi, J. Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends Neurosci.* **33**, 121–129 (2010).
 19. Penzes, P. & VanLeeuwen, J. E. Impaired regulation of synaptic actin cytoskeleton in Alzheimer's disease. *Brain Res. Rev.* **67**, 184–192 (2011).
 20. Alvarez, V. a & Sabatini, B. L. Anatomical and physiological plasticity of dendritic spines. *Annu. Rev. Neurosci.* **30**, 79–97 (2007).
 21. Yang, Y., Wang, X.-B., Frerking, M. & Zhou, Q. Spine expansion and stabilization associated with long-term potentiation. *J. Neurosci.* **28**, 5740–5751 (2008).
 22. Kandel, E. R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* **294**, 1030–8 (2001).
 23. Redolar Ripoll, D. Consolidación de la memoria, sustrato nervioso del refuerzo y adicción. *Psiquiatr. Biológica* **15**, 109–124 (2008).
 24. James, W. *Principles of psychology*. **1**, (Henry Holt and Co., 1890).
 25. Ebbinghaus, H. *Memory: A Contribution to Experimental Psychology*. (Teachers college, Columbia Univ, 1885). at <<http://psychclassics.yorku.ca/Ebbinghaus/>>
 26. Klein, S. *Aprendizaje: Principios y Aplicaciones*. (McGraw-Hill, 1994).
 27. Atkinson, R. C. & Shiffrin, R. M. Human Memory: A Proposed System and its Control Processes. *Psychol. Learn. Motiv. - Adv. Res. Theory* **2**, 89–195 (1968).
 28. Jáuregui, M. & Razumiejczyk, E. Memoria y aprendizaje: Una revisión de los aportes cognitivos. *Rev. virtual la Fac. Psicopedag. la Univ. del Salvador* **1314**, 20–44 (2011).
 29. Siddoway, B., Hou, H. & Xia, H. Molecular mechanisms of homeostatic synaptic downscaling. *Neuropharmacology* **78**, 38–44 (2014).
 30. Brown, R. E. & Milner, P. M. The legacy of Donald O. Hebb: more than the Hebb synapse. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 1013–1019 (2003).
 31. Viana Di Prisco, G. Hebb synaptic plasticity. *Progress in Neurobiology* **22**, 89–102 (1984).
 32. Bliss, T. V. P. & Lomo, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following

- stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* **232**, 331–356 (1973).
33. Frey, U. & Morris, R. G. M. Synaptic tagging and long-term potentiation. *Nature* **385**, 533–536 (1997).
 34. Frey, S., Bergado-Rosado, J., Seidenbecher, T., Pape, H.-C. C. & Frey, J. U. Reinforcement of Early Long-Term Potentiation (Early-LTP) in Dentate Gyrus by Stimulation of the Basolateral Amygdala: Heterosynaptic Induction Mechanisms of Late-LTP. *J. Neurosci.* **21**, 3697–3703 (2001).
 35. Frey, U. & Morris, R. G. M. Synaptic tagging: implications for late maintenance of hippocampal long-term potentiation. *Trends Neurosci.* **21**, 181–188 (1998).
 36. Kim, U., Sanchez-Vives, M. V. & McCormick, D. A. Functional Dynamics of GABAergic Inhibition in the Thalamus. *Science (80-.)*. **278**, 130–134 (1997).
 37. Madison, D. V, Malenka, R. C. & Nicoll, R. A. Mechanisms Underlying Long-Term Potentiation Of Synaptic Transmission. **14**, 379–397 (1991).
 38. Canepari, M., Djuricic, M. & Zecevic, D. Dendritic signals from rat hippocampal CA1 pyramidal neurons during coincident pre- and post-synaptic activity: a combined voltage- and calcium-imaging study. *J. Physiol.* **580**, 463–84 (2007).
 39. Jourdain, P., Fukunaga, K. & Muller, D. Calcium / Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Contributes to Activity-Dependent Filopodia Growth and Spine Formation. *J. Neurosci.* **23**, 10645–10649 (2003).
 40. Razmi, A., Sahebgharani, M. & Khani, M. H. Cyclic AMP Pathway Modifies Memory through Neural Cell Adhesion Molecule Alterations in the Rat Hippocampus. *Acta Med. Iran.* **52**, 246–255 (2013).
 41. Bolshakov, V. Y., Golan, H., Kandel, E. R. & Siegelbaum, S. a. Recruitment of New Sites of Synaptic Transmission During the cAMP-Dependent Late Phase of LTP at CA3–CA1 Synapses in the Hippocampus. *Neuron* **19**, 635–651 (1997).
 42. Frey, U., Krug, M., Reymann, K. G. K. G. & Matthies, H. Anisomycin, an inhibitor of protein synthesis, blocks late phases of LTP phenomena in the hippocampal CA1 region in vitro. *Brain Res.* **452**, 57–65 (1988).
 43. Evans, J. C., Robinson, C. M., Shi, M. & Webb, D. J. The Guanine Nucleotide Exchange Factor (GEF) Asef2 Promotes Dendritic Spine Formation via Rac Activation and Spinophilin-Dependent Targeting. *J. Biol. Chem.* **290**, 10295–10308 (2015).
 44. Pozueta, J., Lefort, R. & Shelanski, M. L. Synaptic changes in Alzheimer’s disease and its models. *Neuroscience* **251**, 51–65 (2013).
 45. Lamprecht, R. & LeDoux, J. Structural plasticity and memory. *Nat. Rev.*

- Neurosci.* **5**, 45–54 (2004).
46. Byth, L. A. Ca²⁺- and CaMKII-mediated processes in early LTP. *Ann. Neurosci.* **21**, 151–153 (2014).
 47. Hölscher, C. Long-term potentiation: a good model for learning and memory? *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **21**, 47–68 (1997).
 48. Bliss, T. V & Collingridge, G. L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **361**, 31–39 (1993).
 49. Zhu, G., Liu, Y., Wang, Y., Bi, X. & Baudry, M. Different Patterns of Electrical Activity Lead to Long-term Potentiation by Activating Different Intracellular Pathways. *J. Neurosci.* **35**, 621–633 (2015).
 50. Kealy, J. & Commins, S. Antagonism of glutamate receptors in the CA1 to perirhinal cortex projection prevents long-term potentiation and attenuates levels of brain-derived neurotrophic factor. *Brain Res.* **1265**, 53–64 (2009).
 51. Slack, J. R. & Pockett, S. Cyclic AMP induces long-term increase in synaptic efficacy in CA1 region of rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* **130**, 69–72 (1991).
 52. Sutherland, D. J. & Goodhill, G. J. The interdependent roles of Ca²⁺ and cAMP in axon guidance. *Dev. Neurobiol.* 402–410 (2013). doi:10.1002/dneu.22144
 53. Brown, G. P. *et al.* Long-term potentiation induced by theta frequency stimulation is regulated by a protein phosphatase-1-operated gate. *J. Neurosci.* **20**, 7880–7887 (2000).
 54. Karege, F., Schwald, M. & El Kouaïssi, R. Drug-Induced Decrease of Protein Kinase A Activity Reveals Alteration in BDNF Expression of Bipolar Affective Disorder. *Neuropsychopharmacology* **29**, 805–812 (2004).
 55. Link, W. *et al.* Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 5734–8 (1995).
 56. Lyford, G. L. *et al.* Arc, a Growth Factor and Activity-Regulated Gene, Encodes a Novel Cytoskeleton-Associated Protein That Is Enriched in Neuronal Dendrites. *Neuron* **14**, 433–445 (1995).
 57. Steward, O., Wallace, C. S., Lyford, G. L. & Worley, P. F. Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. *Neuron* **21**, 741–51 (1998).
 58. Guzowski, J. F. *et al.* Inhibition of Activity-Dependent Arc Protein Expression in the Rat Hippocampus Impairs the Maintenance of Long-Term Potentiation and the Consolidation of Long-Term Memory. *J.*

- Neurosci.* **20**, 3993–4001 (2000).
59. Bramham, C. R., Worley, P. F., Moore, M. J. & Guzowski, J. F. The Immediate Early Gene Arc/Arg3.1: Regulation, Mechanisms, and Function. *J. Neurosci.* **28**, 11760–7 (2008).
 60. Lang, C. *et al.* Transient expansion of synaptically connected dendritic spines upon induction of hippocampal long-term potentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 16665–16670 (2004).
 61. Popov, V. I. *et al.* Remodelling of synaptic morphology but unchanged synaptic density during late phase long-term potentiation (LTP): a serial section electron micrograph study in the dentate gyrus in the anaesthetised rat. *Neuroscience* **128**, 251–62 (2004).
 62. Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G. C. R. & Kasai, H. Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* **429**, 761–766 (2004).
 63. Bramham, C. R. *et al.* The Arc of synaptic memory. *Exp. Brain Res.* **200**, 125–40 (2010).
 64. Peebles, C. L. *et al.* Arc regulates spine morphology and maintains network stability in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 18173–8 (2010).
 65. Chowdhury, S. *et al.* Arc Interacts with the Endocytic Machinery to Regulate AMPA Receptor Trafficking. *Neuron* **52**, 445–459 (2006).
 66. Kerrigan, T. L. & Randall, A. D. A new player in the ‘synaptopathy’ of Alzheimer’s disease - Arc/Arg 3.1. *Front. Neurol.* **4**, 9 (2013).
 67. Okuno, H. *et al.* Inverse synaptic tagging of inactive synapses via dynamic interaction of Arc/Arg3.1 with CaMKII β . *Cell* **149**, 886–98 (2012).
 68. Greer, P. L. *et al.* The Angelman Syndrome-associated ubiquitin ligase Ube3A regulates synapse development by ubiquitinating Arc. *Cell* **140**, 704–716 (2010).
 69. Cardenas-Aguayo, M. del C., Kazim, S. F., Grundke-Iqbal, I. & Iqbal, K. Neurogenic and Neurotrophic Effects of BDNF Peptides in Mouse Hippocampal Primary Neuronal Cell Cultures. *PLoS One* **8**, (2013).
 70. Paxinos, G. & Watson, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. *Elsevier* **5**, (2005).
 71. Spruston, N. Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nat. Rev. Neurosci.* **9**, 206–221 (2008).
 72. Staff, N. P., Jung, H.-Y., Thiagarajan, T., Yao, M. & Spruston, N. Resting and active properties of pyramidal neurons in subiculum and CA1 of rat hippocampus. *J. Neurophysiol.* **84**, 2398–2408 (2000).

73. Roberson, E. D. & Sweatt, J. D. Transient activation of cyclic AMP-dependent protein kinase during hippocampal long-term potentiation. *J. Biol. Chem.* **271**, 30436–30441 (1996).
74. Plath, N. *et al.* Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. *Neuron* **52**, 437–44 (2006).
75. Lisman, J., Yasuda, R. & Raghavachari, S. Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nat. Rev. Neurosci.* **13**, 162–182 (2012).
76. Chetkovich, D. M., Gray, R., Johnston, D. & Sweatt, J. D. N-Methyl-D-aspartate receptor activation increases cAMP levels and voltage-gated Ca²⁺ channel activity in area CA1 of hippocampus. *Neurobiology* **88**, 6467–6471 (1991).
77. Stewart, M. G. *et al.* Chemically induced long-term potentiation increases the number of perforated and complex postsynaptic densities but does not alter dendritic spine volume in CA1 of adult mouse hippocampal slices. *Eur. J. Neurosci.* **21**, 3368–3378 (2005).
78. Park, M., Salgado, J. M. & Ostroff, L. Plasticity-induced growth of dendritic spines by exocytic trafficking from recycling endosomes. *Neuron* **52**, 817–830 (2006).
79. Kelly, P. T. & Vernon, P. Changes in the subcellular distribution of calmodulin-kinase II during brain development. *Brain Res.* **350**, 211–224 (1985).
80. Takahashi, M., Tomizawa, K. & Ishiguro, K. Distribution of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 β , phosphatases 2A and 2B, and phosphorylated tau in the developing rat brain. *Brain Res.* **857**, 193–206 (2000).
81. Strack, S., Kini, S., Ebner, F. F., Wadzinski, B. E. & Colbran, R. J. Differential cellular and subcellular localization of protein phosphatase 1 isoforms in brain. *J Comp Neurol* **413**, 373–384 (1999).
82. Liao, D. & Malinow, R. Deficiency in induction but not expression of LTP in hippocampal slices from young rats. *Learn. Mem.* **3**, 138–149 (1996).
83. Bradley, J. *et al.* Functional expression of the heteromeric ‘olfactory’ cyclic nucleotide-gated channel in the hippocampus: a potential effector of synaptic plasticity in brain neurons. *J. Neurosci.* **17**, 1993–2005 (1997).
84. Postea, O. & Biel, M. Exploring HCN channels as novel drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 903–914 (2011).
85. Biel, M., Wahl-Schott, C., Michalakis, S. & Zong, X. Hyperpolarization-Activated Cation Channels: From Genes to Function. *Physiol. Rev.* **89**, 847–885 (2009).
86. Fiala, J. C., Feinberg, M., Popov, V. & Harris, K. M. Synaptogenesis via

- dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1. *J Neurosci* **18**, 8900–8911 (1998).
87. Yuste, R. & Bonhoeffer, T. Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**, 24–34 (2004).
 88. Koleske, A. J. Molecular mechanisms of dendrite stability. *Nat. Rev. Neurosci.* **14**, 536–50 (2013).
 89. Bourne, J. & Harris, K. M. Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Curr. Opin. Neurobiol.* **17**, 381–386 (2007).
 90. Lüscher, C. & Malenka, R. C. NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, 1–15 (2012).
 91. Yuste, R. Electrical Compartmentalization in Dendritic Spines. *Annu. Rev. Neurosci.* **36**, 429–449 (2013).
 92. Segal, M. Rapid plasticity of dendritic spine: Hints to possible functions? *Prog. Neurobiol.* **63**, 61–70 (2001).
 93. Sala, C. & Segal, M. Dendritic Spines: The Locus of Structural and Functional Plasticity. *Physiol. Rev.* **94**, 141–188 (2014).
 94. Korb, E., Wilkinson, C. L., Delgado, R. N., Lovero, K. L. & Finkbeiner, S. Arc in the nucleus regulates PML-dependent GluA1 transcription and homeostatic plasticity. *Nat. Neurosci.* **16**, 874–83 (2013).
 95. Mayford, M., Wang, J., Kandel, E. R. & O'dell, T. J. CaMKII Regulates the Frequency-Response Function of Hippocampal Synapses for the Production of Both L TD and L TP. *Cell* **81**, 891–904 (1995).
 96. Okamoto, K., Bosch, M. & Hayashi, Y. The roles of CaMKII and F-actin in the structural plasticity of dendritic spines: a potential molecular identity of a synaptic tag? *Physiology* **24**, 357–366 (2009).
 97. Chia, C. & Otto, T. Hippocampal Arc (Arg3.1) expression is induced by memory recall and required for memory reconsolidation in trace fear conditioning. *Neurobiol. Learn. Mem.* **106**, 48–55 (2013).
 98. Shepherd, J. D. & Bear, M. F. New views of Arc, a master regulator of synaptic plasticity. *Nat. Neurosci.* **14**, 279–84 (2011).
 99. Rodríguez, J. J. *et al.* Long-term potentiation in the rat dentate gyrus is associated with enhanced Arc/Arg3.1 protein expression in spines, dendrites and glia. *Eur. J. Neurosci.* **21**, 2384–96 (2005).
 100. Waltereit, R. *et al.* 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**, 5484–5493 (2001).
 101. Enriquez-Barreto, L. *et al.* Learning improvement after PI3K activation

- correlates with de novo formation of functional small spines. *Front. Mol. Neurosci.* **6**, 54 (2014).
102. Bloomer, W. A. C., Vandongen, H. M. A. & Vandongen, A. M. J. Activity-regulated cytoskeleton-associated protein Arc/Arg3.1 binds to spectrin and associates with nuclear promyelocytic leukemia (PML) bodies. *Brain Res.* **53**, 20–33 (2007).
 103. Bernardi, R. & Pandolfi, P. P. Structure , dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 1007–1016 (2007).
 104. Korb, E. & Finkbeiner, S. PML in the brain : from development to degeneration. **3**, 1–5 (2013).
 105. Zamanillo, D. *et al.* Importance of AMPA Receptors for Hippocampal Synaptic Plasticity But Not for Spatial Learning. **1805**, (2007).
 106. Wee, C. L. *et al.* Nuclear Arc Interacts with the Histone Acetyltransferase Tip60 to Modify H4K12 Acetylation. *Neuronal Excit.* **0**, 20 (2014).
 107. Okuno, H. Regulation and function of immediate-early genes in the brain: beyond neuronal activity markers. *Neurosci. Res.* **69**, 175–86 (2011).
 108. Borrelli, E., Montmayeur, J. P., Foulkes, N. S. & Sassone-Corsi, P. Signal transduction and gene control: the cAMP pathway. *Crit. Rev. Oncog.* **3**, 321–38 (1992).
 109. Kawashima, T. *et al.* Synaptic activity-responsive element in the Arc/Arg3.1 promoter essential for synapse-to-nucleus signaling in activated neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 316–21 (2009).
 110. Yiu, A. P., Rashid, A. J. & Josselyn, S. A. Increasing CREB Function in the CA1 Region of Dorsal Hippocampus Rescues the Spatial Memory Deficits in a Mouse Model of Alzheimer’s Disease. *Neuropsychopharmacology* **36**, 2169–2186 (2011).
 111. Xiu-Fang, L. *et al.* NAc shell Arc/Arg3.1 protein mediates reconsolidation of morphine CPP by increased GluR1 cell surface expression: Activation of ERK-coupled CREB is required. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **18**, 1–10 (2015).