

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SEDE SUR

DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA

“Dinámica de expresión de la proteína Arc en la retina”

T E S I S

Que presenta

Med. Cir. Luis Gómez Gómez

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

en

Neurofarmacología y Terapéutica Experimental

Directoras de la Tesis:

Dra. Mónica Lamas Gregori

Dra. Perla del Rocío Moreno Castilla

Ciudad de México

Agosto, 2024

Este proyecto se desarrolló en los Laboratorios 4-1 y 5-3 del Centro de Investigaciones sobre Envejecimiento, del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav) bajo la dirección de la Dra. Mónica Lamas Gregori adscrita al departamento de farmacobiología del Cinvestav y la Dra. Perla del Rocío Moreno Castilla adscrita al Centro de Investigación sobre Envejecimiento en la Sede sur del Cinvestav.

El trabajo se realizó con el apoyo del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT)

a través de la beca de maestría con número: 1215114. Este trabajo fue financiado por la International Brain Organization (IBRO; Early Career Award) y la International Society for Neurochemistry (ISN; Return Home Grant), otorgados a la Dra. Moreno-Castilla y de los proyectos CF-2019-51488 y A1-S-25777 del laboratorio de la Dra. Mónica Lamas.

Agradecimientos al apoyo científico y técnico

El presente trabajo se realizó bajo la asesoría de la **Dra. Perla del Rocío Moreno Castilla** y la **Dra. Mónica Lamas Gregori** en el 4/1 (Laboratorio de Resiliencia Cognitiva) y el Laboratorio 5/3 del Centro de Investigaciones sobre el Envejecimiento del Cinvestav.

Se agradece también la asesoría y el atento apoyo del comité sinodal involucrado en este proyecto: gracias a la **Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez** y al **Dr. Emilio Javier Galván Espinosa**.

El soporte invaluable de las asesoras se complementó con la ayuda constante de la **Dra. Tzindilu Molina Muñoz**, quien participó activamente en los experimentos. Adicionalmente agradezco su apoyo con el manejo del microscopio confocal del Centro de Investigaciones sobre el Envejecimiento.

Agradezco también su apoyo científico y técnico a la **QBP Ivonne Yamilet Lezama Sandoval del laboratorio 5/3 del CIE** y a la **QFB Cristina Aranda Fraustro del IFC de la UNAM**, quienes estuvieron siempre atentas ante cualquier requerimiento del proyecto.

Índice

Resumen	1
Abstract.....	2
Prólogo	3
La visión	5
El sentido de la visión	5
La vía visual.....	6
Plasticidad en la vía visual.....	12
Plasticidad retiniana.....	14
Arc, proteína asociada al citoesqueleto regulada por actividad.....	15
Planteamiento del problema	22
Objetivo general.....	23
Objetivos específicos	23
Diseño experimental	24
Resultados.....	31
La proteína Arc se expresa en la retina	31
Arc se expresa en la capa nuclear interna y la capa de células ganglionares de la retina.....	32
Inducción de Arc a través de la estimulación luminosa	36
Cinética de expresión de Arc en retina y corteza visual	37
Discusión	40
Conclusiones	44
Figuras complementarias.....	45

Índice de figuras

Figura 1. Ilustración de la anatomía del ojo humano.	5
Figura 2. Representación esquemática de la vía visual.....	7
Figura 3. Ilustración de la estructura de la retina.	8
Figura 4. Tipos celulares de la retina y sus conexiones.....	10
Figura 5. Representación anatómica de las capas de la corteza visual primaria...	12
Figura 6. Esquematización de la regulación de la expresión de Arc.....	16
Figura 7. Esquematización del diseño experimental.....	24
Figura 8. Esquema que muestra la técnica CLARITY en la retina.....	29
Figura 9. Inmunofluorescencia contra Arc en corte sagital de la retina.....	31
Figura 10. Western Blot de la expresión de Arc en corteza visual y retina de ratas bajo protocolo de estimulación.....	32
Figura 11. CLARITY en retinas de ratas perfundidas	33
Figura 12. Expresión de Arc en la capa ganglionar de la retina.....	34
Figura 13. Expresión de Arc en la capa nuclear interna	35
Figura 14. Conducta durante la estimulación lumínica	36
Figura 15. Expresión diferencial de Arc en la corteza visual primaria de ratas Wistar macho	37
Figura 16. Cinética de expresión de Arc en la retina a través de Western Blot.	38
Figura 17. Cinética de expresión de Arc en la corteza visual a través de Western Blot.....	39

Resumen

Los mecanismos de la plasticidad retiniana no se conocen del todo. La proteína asociada al citoesqueleto regulada por actividad (Arc) desempeña un papel crucial en la plasticidad neuronal, exhibiendo una regulación espaciotemporal excepcional, vinculada a la actividad neuronal en el cerebro. Sin embargo, la dinámica de la expresión de la proteína Arc en la retina no se conoce. Comprender este proceso podría identificar un actor clave subyacente a la plasticidad retiniana. Utilizando técnicas inmunohistoquímicas en tejido deslipidificado (CLARITY) y Western Blot, investigamos la expresión de la proteína Arc en la retina y su respuesta temporal a la experiencia visual tras la privación de luz. Encontramos que la proteína Arc está presente en la capa nuclear interna y en la capa de células ganglionares de la retina. Tras la privación de luz, la estimulación visual indujo un aumento en los niveles de proteína Arc en la retina, alcanzando un pico de expresión a las 2 h. Esto es comparable a la dinámica de Arc en la corteza visual y otras regiones del SNC. Nuestros resultados respaldan la participación de Arc en la regulación de la plasticidad sináptica dependiente de la experiencia en la retina. Este conocimiento tiene el potencial de contribuir significativamente a nuestra comprensión tanto de la función retiniana fisiológica como patológica.

Abstract

The mechanisms of retinal plasticity are still unknown. The activity-regulated cytoskeleton-associated protein (Arc) plays a crucial role in neural plasticity, exhibiting exceptional spatiotemporal regulation linked to neuronal activity in the brain. However, the dynamics of Arc protein expression in the retina remain unknown. Understanding this process could identify a key player underlying retinal plasticity. Using immunohistochemical techniques on delipidated tissue (CLARITY) and Western Blot analysis, we investigated Arc protein expression in the retina and its temporal response to visual experience following light deprivation. We found that Arc protein is present in the inner nuclear layer and the retinal ganglion cell layer. Following light deprivation, visual experience induced an increase in Arc protein levels in the retina, reaching a peak of expression at 2 hours. This is comparable to Arc dynamics in the visual cortex and other regions of the CNS. Our results support the involvement of Arc in the experience-dependent regulation of synaptic plasticity in the retina. This knowledge has the potential to contribute significantly to our understanding of both physiological and pathological retinal function.

Prólogo

El sentido de la visión cumple un rol vital en la supervivencia animal. Permite percibir el entorno, reconocer a los congéneres, encontrar alimento y evitar depredadores. La importancia de la visión ha sido reconocida a lo largo de la historia de la humanidad. En la filosofía griega, Platón utilizó la analogía de la "caverna" para describir cómo nuestra percepción visual limitada puede afectar nuestra comprensión del mundo (Platón, 380 a.C./1997). En la Edad Media, Santo Tomás de Aquino discutió la relación entre los sentidos y la percepción en su obra Summa Theologica, donde coloca a la visión como el más elevado de todos los sentidos (Tomás de Aquino, 1274/2006). A lo largo de la historia la vista ha sido estudiada desde una perspectiva científica, tomando parte la medicina, la psicología y la neurociencia.

Las enfermedades visuales son un problema importante para la población. Según el primer Informe Mundial sobre la Visión de la Organización Mundial de la Salud (OMS), 2200 millones de personas en el mundo viven con algún tipo de dificultad visual. En hasta más de 1000 millones estos problemas son prevenibles, y por desgracia, muchos de ellos no reciben tratamiento (World report on vision, 2019). Según este reporte, las afecciones más frecuentes son:

- Miopía (2.600 millones de personas)
- Presbicia (1.800 millones)
- Degeneración macular (196 millones)
- Retinopatía diabética (146 millones)
- Glaucoma (76 millones)

Estos problemas de visión afectan a las personas de manera desigual, impactando con mayor frecuencia a grupos vulnerables, es decir, personas que viven zonas rurales, que tienen bajos ingresos, a las mujeres, a los ancianos, a las personas con

discapacidad, a las minorías étnicas y a las poblaciones indígenas (Peraza de Aparicio, 2023).

En el caso de México, se estima que alrededor de 2 millones 237 mil individuos presentan alguna limitación visual. Las seis principales afecciones oculares que impactan a la población mexicana abarcan problemas de refracción (como miopía, hipermetropía, astigmatismo y presbicia), cataratas, degeneración macular, glaucoma, retinopatía diabética y opacidad corneal (INEGI, 2020).

Comprender las bases fisiológicas de la visión puede ayudar a mejorar la calidad de vida de millones de personas. En la presente tesis se exponen los resultados obtenidos en un estudio cuyo objetivo fue aportar conocimiento novedoso en el área, buscando un sustento molecular de la plasticidad retiniana, fenómeno fisiológico ampliamente implicado en la patología ocular (Stretto et al., 2022).

Introducción

La visión

El sentido de la visión

El sentido de la visión es el que nos permite percibir los estímulos luminosos y transformarlos en imágenes mentales que representan la realidad externa (Guyton & Hall, 2020). El órgano encargado de captar la luz es el ojo; dentro de sus partes, destacan estructuras que regulan el paso y la refracción de los rayos luminosos, como la córnea, la pupila, el iris y el cristalino (Figura 1). La luz captada viaja por el humor acuoso y el humor vitreo hasta llegar a la retina; una extensión del sistema nervioso central (SNC) donde se encuentran las células fotorreceptoras llamadas bastones y conos, que son sensibles a la intensidad y al color de la luz, respectivamente (Boron & Boulpaep, 2016). Estas células convierten la luz en impulsos eléctricos que viajan por el nervio óptico hasta el cerebro, donde se procesan e interpretan las imágenes en la corteza visual. El sentido de la visión nos permite apreciar aspectos como la forma, el tamaño, la distancia, el movimiento y la posición de los objetos, así como distinguir entre más de 10 millones de colores diferentes (Levin et al., 2011).

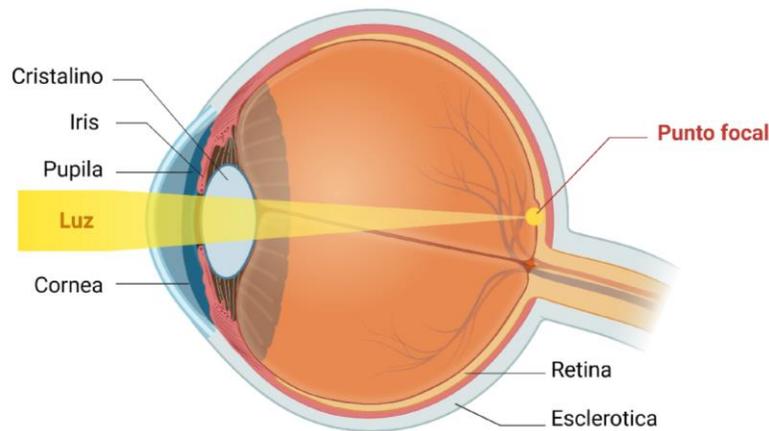


Figura 1. Ilustración de la anatomía del ojo humano. La luz (ilustrada en amarillo) es captada por las partes ópticas del ojo (que funcionan igual que una cámara fotográfica) y se condensa en algún punto de la retina (parte más posterior del ojo, marcada en amarillo) para la posterior fototransducción. Elaboración propia con BioRender

La vía visual

La vía visual es el camino que recorre la información desde la retina hasta múltiples áreas del cerebro donde se integra finamente hasta conformar el sentido de la visión. La señal lumínica es percibida en la retina a través de distintas células fotorreceptoras, que transducen la señal lumínica (fotones) en una señal eléctrica (cambios en el potencial de membrana de las células excitables). Estas células realizan su primera y segunda sinapsis en este mismo tejido, con las células bipolares y ganglionares respectivamente (Boron & Boulpaep, 2016). Los axones de estas últimas conforman el nervio óptico que realizará una tercera sinapsis en el núcleo geniculado lateral (NGL) y en otras partes del cerebro medio. En estas dos partes de la vía, la información visual ya está empaquetada en distintos tipos según sus cualidades físicas. Desde el NGL la información visual empaquetada viaja hacia una 4ta sinapsis con las neuronas en la corteza visual, donde la información esta finamente estructurada en capas y columna. Desde aquí la información visual viaja a otras áreas del cerebro donde realiza una quinta sinapsis para terminar de integrar el sentido de la visión (Ungewiss, J. et al., 2020).

Dentro del campo visual, la zona central de lo que observa un individuo es captada por ambas retinas, mientras que las partes más periféricas son solo visualizadas por las retinas del lado correspondiente. La información captada por este tejido se empaqueta en el nervio óptico, cuyas fibras de la porción nasal de cada retina decusarán a nivel del quiasma óptico. Las fibras nerviosas temporales siguen su curso en el mismo hemisferio (Guyton & Hall, 2020). En la retina, se da un procesamiento sobre la orientación, el color, el contraste, la visión binocular y la dirección del movimiento. El NGL tiene una organización en 6 capas que distinguen la información según su origen, de la hemiretina contralateral o de la ipsilateral. Desde aquí la información viaja empaquetada según las características del primer nivel de procesamiento que se menciona anteriormente (Kandel, E. et al, 2011). En el NGL dos tipos de neuronas distintas, divididas histológicamente como magnocelulares y parvocelulares formarán las radiaciones ópticas, encargadas de

llevar la información hasta regiones específicas de la corteza visual, IVCa e IVCb respectivamente, con la intención de preservar el empaquetamiento de la información visual desde la retina hasta la corteza visual. Esta misma se organizará en columnas dentro de esta región dando lugar a un segundo procesamiento de la información visual, considerando las propiedades de la superficie que se está mirando, integrando contornos, discriminando formas, distinguiendo el fondo y dando forma a objetos en movimiento. Finalmente, desde la corteza visual surgirán nuevas proyecciones hacia otras áreas del cerebro, como el lóbulo parietal o el lóbulo temporal, que constituyen un alto nivel de procesamiento y ayudarán al reconocimiento final del objeto que se esté mirando (Kandel, E. et al, 2011).

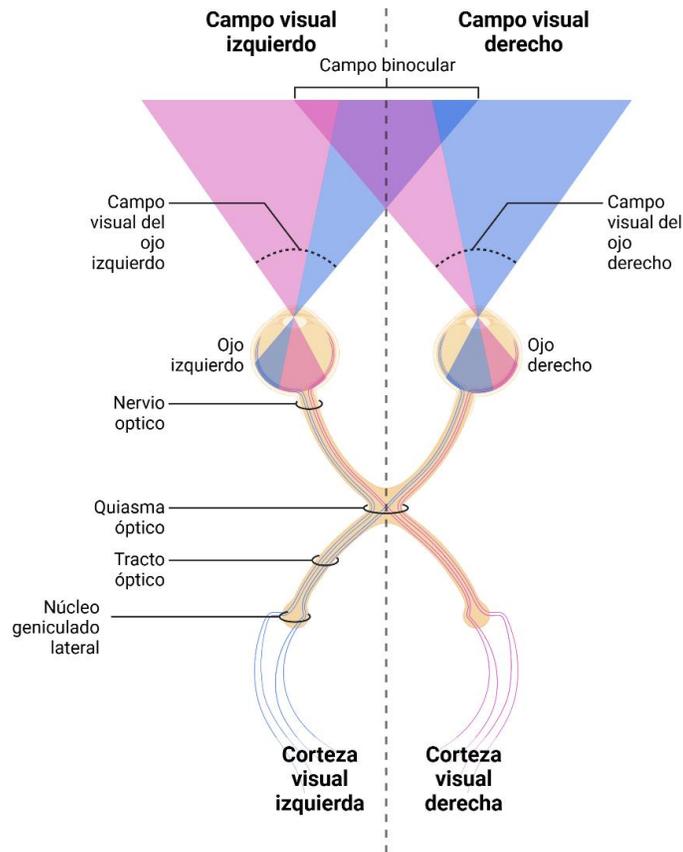


Figura 2. Representación esquemática de la vía visual. Las retinas nasales se decusan a nivel del quiasma óptico. El NGL empaqueta la información visual previamente procesada en la retina y ayuda a la formación de los mapas retinotópicos en la corteza visual. Desde esta última, la información viaja a múltiples áreas del cerebro para ser integrada en el sentido de la visión. Elaboración propia con BioRender.

La retina

La retina es la capa más interna del ojo, formada por varias capas de células (Fig. 3). En este tejido se traduce la señal lumínica captada por el ojo en una señal eléctrica, que es transmitida luego a lo largo de la vía visual. Fotorreceptores, células bipolares y células ganglionares se comunican sinápticamente con ayuda de las células amacrinas, horizontales y la glía de Müller para procesar la información visual (Revista mexicana de oftalmología, 2022).

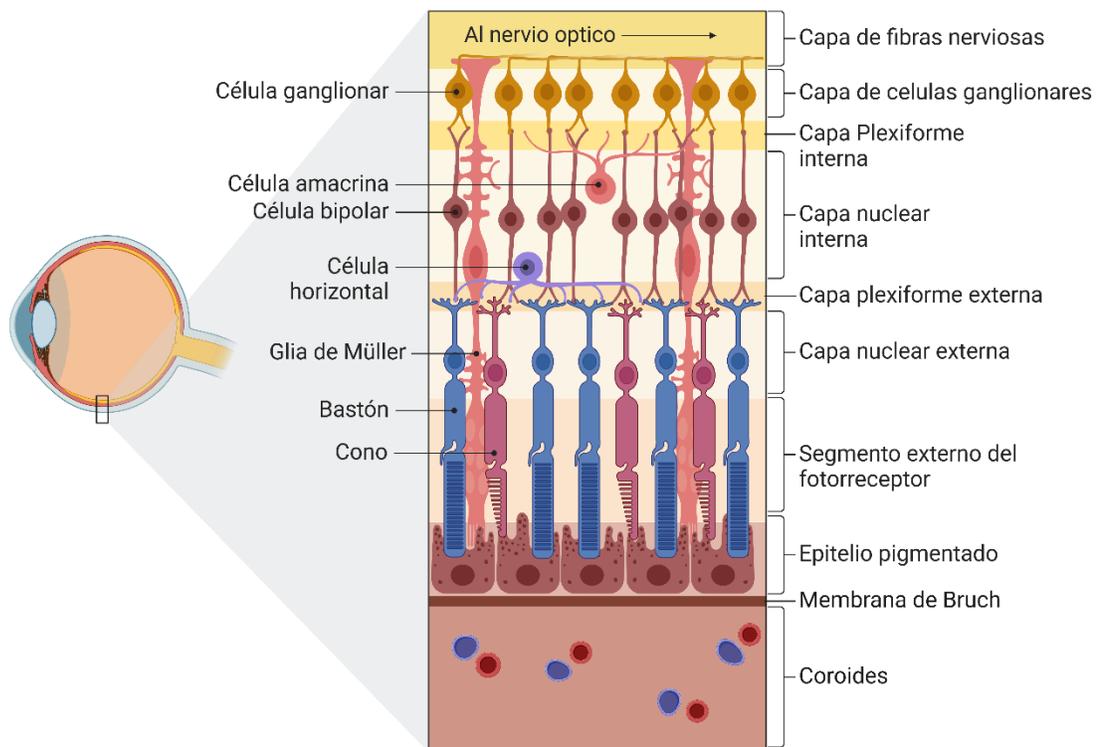


Figura 3. Ilustración de la estructura de la retina. Las células nerviosas están altamente organizadas en distintas capas que contienen cuerpos y/o proyecciones celulares. Elaboración propia con BioRender.

En el proceso visual, la retina desempeña un papel central, organizando la información sensorial en una sucesión de capas neuronales especializadas. Los fotorreceptores, principalmente conos y bastones, constituyen el primer relevo neuronal en la transducción sensorial. Los conos favorecen la visión diurna y tienen una máxima densidad en la fovea (área de mayor agudeza visual) para lograr la

máxima resolución y percepción del color. Los bastones, predominantes en la periferia de la retina, son esenciales en condiciones de baja luminosidad. Las células bipolares, como segundo relevo, facilitan la transmisión de señales al conectarse específicamente con los fotorreceptores. Con la intención de generar especificidad a la respuesta de los estímulos, estas últimas neuronas tienen una excitabilidad condicionada con relación a la luz (células ON) y otras a la oscuridad (células OFF). El tercer relevo neuronal, compuesto por aproximadamente 1.2 millones de células ganglionares de la retina, exhibe una diversidad de subtipos que contribuyen a canales visuales especializados, proyectándose hacia áreas específicas en la corteza visual. La organización retiniana retinotópica persiste a lo largo de la vía visual, garantizando la coherencia espacial en la transmisión de la información. Se destaca la inversión de capas en la retina de vertebrados, como en los humanos, así como la presencia de células ganglionares fotosensibles intrínsecas implicadas en la regulación del ciclo circadiano. Los axones de las células ganglionares convergen en el nervio óptico, donde ocurre el cruce de fibras en el quiasma óptico, simplificando el procesamiento visual hemisférico (Ungewiss, J. et al., 2020). Otros tipos celulares en la retina, como las células horizontales y amacrinas, son interneuronas de distintos tipos que regulan la comunicación entre fotorreceptores, células bipolares y células ganglionares. Además, la glía de Müller constituye el principal tipo glial en la retina, encargado entre muchas otras cosas de la homeostasis metabólica en este tejido.

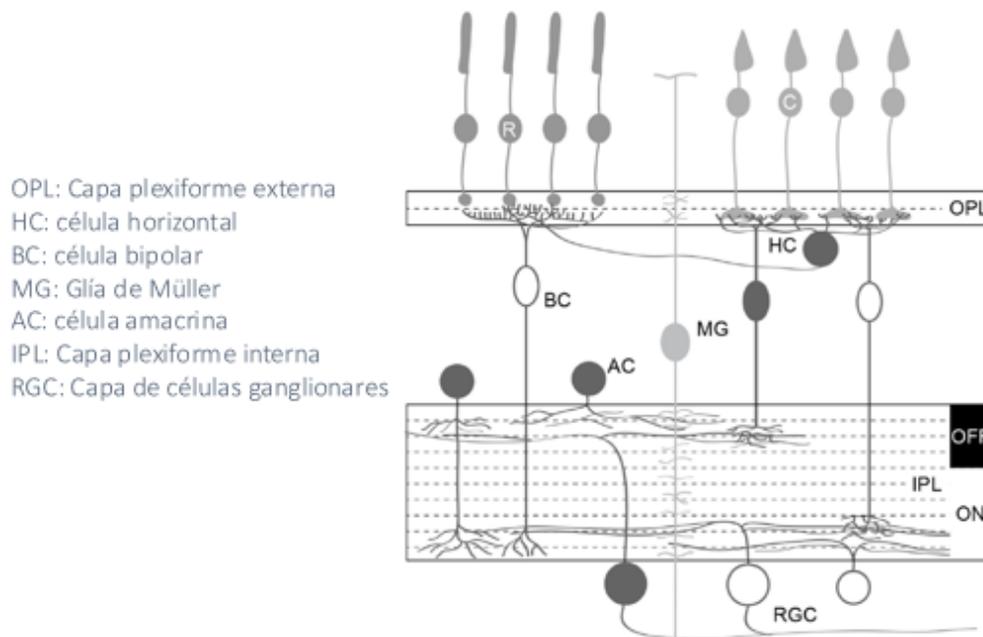


Figura 4. Tipos celulares de la retina y sus conexiones. En la capa plexiforme externa se da la conexión entre fotoreceptores y células bipolares. En esta área también se recibe retroalimentación de células horizontales. Las células bipolares transmiten la señal de la retina externa a la interna, donde en su capa plexiforme se realiza la invasión de células ganglionares y amacrinas, las cuales conforman el nervio óptico y proporcionan retroalimentación a las células bipolares, respectivamente. Imagen extraída de Fitzpatrick MJ & Kerschensteiner D., 2022.

Núcleo geniculado lateral

El NGL es una parte del tálamo, el cual es el principal centro de retransmisión de la información sensorial hacia la corteza cerebral. El NGL se encarga de procesar la información visual que proviene de la retina a través del nervio óptico y de enviarla a la corteza visual primaria mediante las radiaciones ópticas. El NGL tiene una organización laminar, con seis capas distintas en los humanos y los macacos. Las dos capas internas son llamadas magnocelulares y reciben información de los bastones, que son sensibles al movimiento, la profundidad y las diferencias de brillo. Las cuatro capas externas son llamadas parvocelulares y reciben información de los conos, que son sensibles al color y a los detalles finos. El NGL también recibe numerosas conexiones de retroalimentación desde la corteza visual primaria, lo que le permite modular la transmisión de las señales visuales según el contexto y la atención (Kandel, et al, 2013).

Corteza visual

La corteza visual primaria recibe información retinotópica, es decir, conserva la disposición espacial de los estímulos visuales tal y como son percibidos en la retina. Además, se encarga de analizar aspectos básicos de la visión, como la forma, el tamaño, el color y el movimiento de los objetos. Desde la corteza visual primaria se proyectan fibras hacia otras áreas corticales denominadas extraestriadas, que se ocupan de funciones visuales más complejas, como el reconocimiento facial, la percepción espacial o la integración multisensorial (Purves et al, 2018).

En la corteza visual primaria pueden distinguirse 6 capas anatómicas. La información desde el NGL llega principalmente a la 4ta capa, desde donde realizan sinapsis principalmente con las células estrelladas de las capas superiores 2 y 3. Las células piramidales de estas 2 capas se dirigen a las piramidales de la capa 5, cuyos axones se proyectan tanto a células piramidales de la capa 6 como de vuelta a las capas 2 y 3. Cada capa, salvo la 4, emite eferencias a distintos tipos celulares de la capa 1 de la corteza visual, y desde las áreas 1, 2 y 3 se proyectan las neuronas a otras regiones del cerebro, como la corteza temporal o parietal (Fig. 5). Las células de la capa 6 tienen incluso eferencias al NGL para refinar la información que es recibida (Kandel, E. et al, 2011). El refinamiento de estas conexiones en la corteza visual implica cambios plásticos, modulados por la actividad lumínica percibida por la retina (Feller, M. B., 2003).

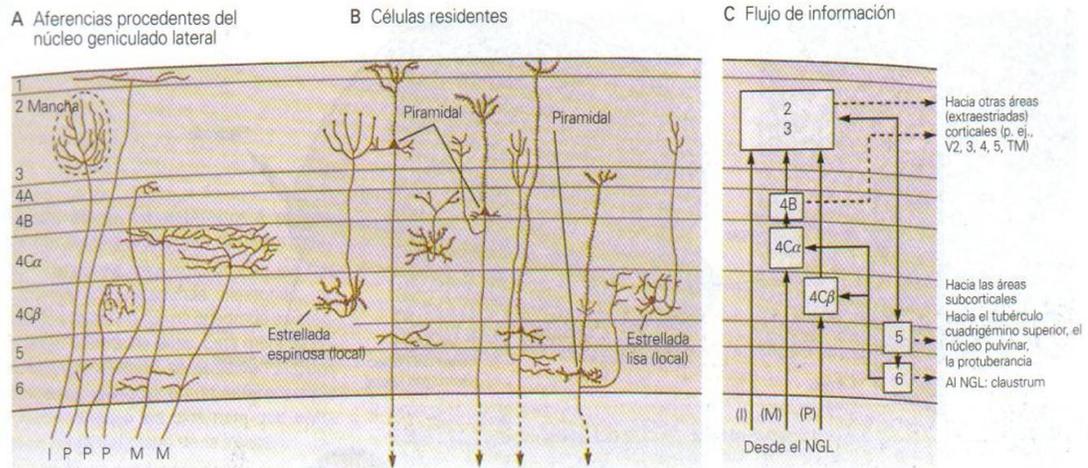


Figura 5. Representación anatómica de las capas de la corteza visual primaria. La información captada desde la retina conserva su estructura espacial en la corteza visual. Desde el NGL llegan proyecciones a la 4ta capa de la corteza, y desde aquí, la información es procesada en las distintas capas de la corteza visual, para un procesamiento profundo de la información y su proyección a otras regiones cerebrales para terminar con la integración del sentido de la visión. Imagen extraída del libro *Principles of neural science*. 5 ed. Kandel, E. et al, 2011.

Plasticidad en la vía visual

La plasticidad neural es la capacidad del sistema nervioso para modificar su estructura y función en relación con el desarrollo, la experiencia y la lesión (Von Bernhardt et al., 2017). Cambios moleculares modulan la interconectividad neuronal a múltiples niveles desde una sola célula, la sinapsis y circuitos, influyendo incluso en el comportamiento (Gulyaeva., 2017).

Los cambios plásticos que ocurren en la sinapsis (y en el resto de la neurona) son dependientes del tiempo y de la actividad de las neuronas involucradas. La intensidad de las despolarizaciones presinápticas en relación con la liberación de neurotransmisores en la terminal sináptica condiciona una respuesta eléctrica y molecular mediada por distintas moléculas. (Strettoi et al., 2022). El mantenimiento del tiempo de esta respuesta a lo largo de minutos y horas genera cambios en la función y estructura de la sinapsis, potenciándolas o debilitándolas a tiempos cortos o largos (potenciación a largo plazo (LTP) y depresión a largo plazo (LTD), que pueden ocasionar modificaciones estructurales en las neuronas involucradas. Adicionalmente, estos cambios electrofisiológicos son censados a nivel del circuito en el que están involucrados, generando un escalamiento global de la respuesta en

un fenómeno denominado plasticidad homeostática, donde las sinapsis se modulan para prevenir una sobreexcitación o un exceso en la depresión excitatoria (Citri y Malenka, 2008).

El papel central de los neurotransmisores, especialmente el glutamato y sus receptores, en la regulación de la plasticidad ha sido ampliamente estudiado. Sin embargo, en la actualidad, se reconoce que los mecanismos moleculares involucrados van mucho más allá de la neurotransmisión glutamatérgica. La plasticidad sináptica también implica la participación de proteínas señalizadoras, factores de crecimiento y factores de transcripción (Citri y Malenka, 2008).

La investigación pionera de Hubel y Wiesel (Hubel & Wiesel, 1959) estableció el concepto crucial de un período de desarrollo visual sensible durante los primeros años de vida, donde la plasticidad cortical es especialmente susceptible a las influencias ambientales. Aunque este paradigma ha sido ampliamente aceptado, se reconoce ahora que persiste cierta plasticidad limitada en la edad adulta en distintos puntos de la vía visual. Una serie de funciones visuales, como la visión binocular, pueden modificarse como resultado del aprendizaje y la modificación de las condiciones a las que se sometan los participantes, generando adaptaciones que pueden durar mucho tiempo. Técnicas de estimulación cerebral no invasivas como la estimulación magnética transcraneal y la estimulación transcraneal de corriente continua inducen cambios funcionales en el cerebro adulto, y cambios plásticos pueden ser inducidos por la adaptación y la privación visual (Zhou, J. et al., 2017).

La privación de la experiencia visual, colocando a los roedores en oscuridad, y luego sometiéndolos a estimulación lumínica es un modelo que se ha utilizado históricamente para evocar cambios plásticos en distintos niveles de la vía visual (Fan et al., 2023; Feller, 2003; Wang et al., 2006a). La adaptación a distintos estímulos visuales implica cambios en la estructuración de la vía visual asociados

a expresión de proteínas de plasticidad sináptica (Feller, 2003; Wang et al., 2006; Pinaud et al., 2002)

Plasticidad retiniana

La retina es un órgano sensorial, pero su actividad no depende estrictamente de la experiencia sensorial. Durante el desarrollo intrauterino, y aun antes de abrir los ojos, la retina tiene actividad eléctrica (y molecular) espontánea que permite el refinamiento de las conexiones internas intra-retinianas y de las sinapsis con otras partes del SNC para conformar la vía visual (Tian & Copenhagen, 2003). Los cambios que ocurren durante el desarrollo de la retina incluyen la poda de las dendritas ganglionares en la retina y la aparición específica de respuestas excitatorias o inhibitorias según el estímulo, ambos son cambios celulares relacionados con la plasticidad neural (Feller, 2003).

La plasticidad en la retina desarrollada es una característica que se ha debatido dada la gran capacidad de este tejido para mantener una organización estructural y funcional estable (Strettoi et al., 2022). Es de vital importancia que las señales visuales que son recibidas sean claras y lo menos variables. Aun así, se sabe que existen cambios en los circuitos retinales desarrollados; un ejemplo es la plasticidad estructural en los receptores (conos y bastones), lo cual resulta interesante dado que sus sinapsis no son dependientes de potenciales de acción, sino más bien de cambios graduados en su potencial de membrana. Estos cambios graduados propician una reestructuración en la forma de la terminal sináptica del fotorreceptor dependiente de la luz, presumiblemente por un cambio en el equilibrio entre endocitosis y la exocitosis (Pinaud R., et al, 2013). Se ha evidenciado brote de neuritas en la retinosis pigmentaria, el desprendimiento de la retina, el daño por láser y otros modelos de daño en los bastones. Además, existe evidencia de que las células bipolares, amacrinas, horizontales y ganglionares muestran la capacidad de realizar 5 procesos dinámicos durante el desarrollo: la formación de neuritas, la formación de fascículos, sinaptogénesis, auto señalización y migración (Strettoi et al., 2022). Y, por si fuera poco, hay evidencia de que entre los 112 distintos tipos

neuronales que existen en la retina de ratón se dan cambios plásticos homeostáticos que permiten preservar la función retiniana frente a la neurodegeneración, gracias a la excitabilidad intrínseca, el escalamiento de las sinapsis existentes, la reestructuración de las sinapsis e incluso la formación de nuevas neuronas (Fitzpatrick y Kerschensteiner, 2023).

Los registros electrofisiológicos realizados en pez cebra en han demostrado que tanto las estimulaciones eléctricas como las visuales repetidas inducen LTP en las sinapsis excitatorias que existen entre células bipolares y ganglionares en la retina de larvas, pero no en peces cebra jóvenes. La LTP existe en la retina y puede servir para el refinamiento de los circuitos retinianos de forma dependiente a la experiencia visual en el desarrollo (Wei et al., 2012).

Arc, proteína asociada al citoesqueleto regulada por actividad

La proteína Arc fue identificada por primera vez en 1995 por Lyford y cols. El mensajero de ARN (ARNm) de Arc tiene aproximadamente 3.2 kb y codifica una proteína con un peso molecular de 55 kDa (Lyford et al., 1995b). Tanto la proteína como el ARNm de Arc han emergido como un elemento clave en la investigación neurocientífica debido a su papel esencial en la formación de la memoria a largo plazo y su estrecha relación con los procesos de plasticidad neuronal y sináptica, además de su compleja regulación asociada a la actividad (Myrum, C., et al, 2022).

Regulación de la expresión de Arc

La producción, localización y estabilidad de la proteína Arc es controlada por actividad neuronal a través de múltiples mecanismos, regula la fuerza sináptica y está involucrada en todas las formas conocidas de plasticidad (Bramham et al., 2008). Los transcritos de Arc aparecen 5 minutos posteriores a la estimulación (Ramírez-Amaya et al., 2005). Dicha estimulación depende de la actividad neuronal, medida a nivel celular por la activación de receptores de BDNF, glutamato, NMDA

y acetilcolina. Un nodo central para la transcripción de Arc es la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK) (Soulé et al., 2012). Antes de ser traducido, el ARNm de Arc tiene una regulación adicional. 30 minutos tras la estimulación el ARNm es trasladado desde el núcleo al citoplasma, y en 1 h puede viajar a los extremos dendríticos más distales, donde tiene una vida media de aproximadamente 47 minutos, suficientes para participar en las distintas formas de plasticidad (Rao et al., 2006). La estimulación glutamatérgica de receptores metabotrópicos acoplados a proteínas Gs parece propiciar la traducción de Arc en las dendritas. La interacción de Arc con otras proteínas, como actina, WAVE3 o distintos receptores, determina la función de Arc en la LTP, la LTD, la plasticidad estructural, la plasticidad homeostática y el comportamiento (Korb & Finkbeiner, 2011).

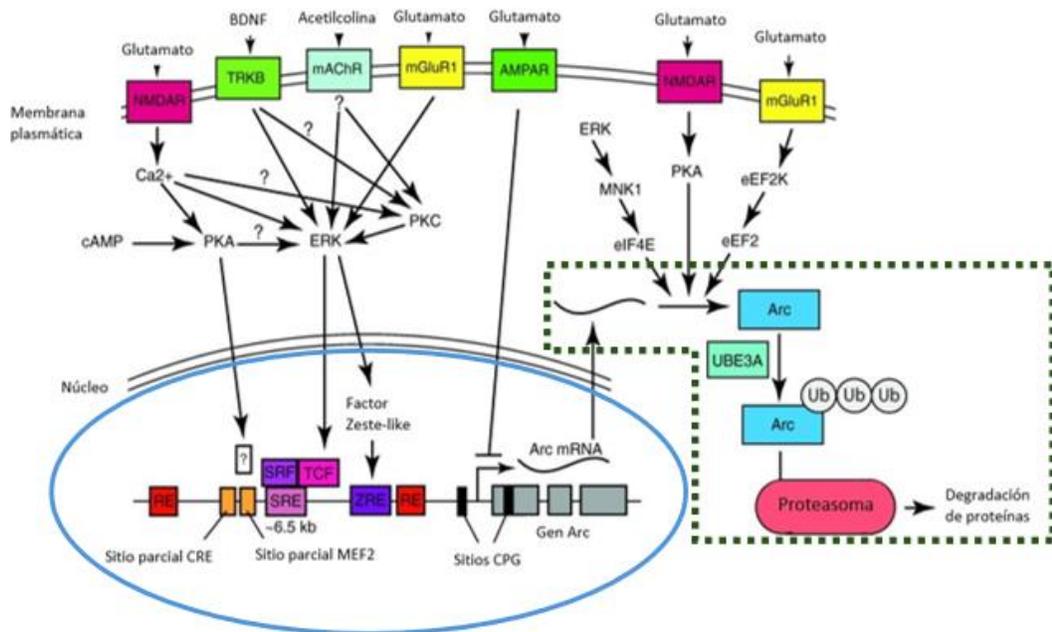


Figura 6. Esquematización de la regulación de la expresión de Arc. Se ilustran los distintos fenómenos involucrados en la transcripción de Arc, incluyendo las vías moleculares identificadas en el núcleo (regulación a nivel génico) y en las dendritas (regulación a nivel de transcrito, línea punteada verde), y una simplificación de la traducción del mRNA. Imagen extraída, traducida y editada de Korb & Finkbeiner, 2011

El ARNm de Arc es inducido rápidamente mediante un estímulo dependiente de receptores glutamatérgicos (receptores AMPA) (Lyford et al., 1995b), de receptores tipo tirosina cinasa (RTK) (Bramham, Worley, Moore, & Guzowski, 2008) y por mecanismos dependientes de dopamina (Fosnaugh, Bhat, Yamagata, Worley, & Baraban, 1995), los cuales desencadenan la cascada de señalización dependiente de la proteína extracelular reguladora de cinasas (ERK) y la proteína cinasa A (PKA) favoreciendo la transcripción de Arc. El ARNm es transportado a través del axón hasta las dendritas (Lyford et al., 1995a) (Link et al., 1995), distribuyéndose en las regiones que intervienen en los estímulos sinápticos, donde se traduce la proteína (O. Steward, Wallace, Lyford, & Worley, 1998). La síntesis *de novo* de Arc es necesaria para favorecer la plasticidad sináptica, la estabilización y consolidación de la memoria a largo plazo (Guzowski et al., 2000).

Función de Arc

La proteína Arc desempeña múltiples funciones esenciales, especialmente en la plasticidad sináptica. Su interacción con la actina es crucial para la formación de microfilamentos, componentes del citoesqueleto indispensables para la creación de espinas dendríticas, lo que favorece la plasticidad sináptica, la consolidación y el mantenimiento de la memoria a largo plazo (Guzowski et al., 2000). Diversas pruebas conductuales, como la memoria espacial en el laberinto acuático de Morris, el condicionamiento al miedo y el reconocimiento de objetos, han demostrado la participación de Arc en la memoria a largo plazo (Plath et al., 2006). Arc también juega un papel activo en la modificación estructural, incrementando la densidad postsináptica (Bourne & Harris, 2008) y alargando las espinas dendríticas postsinápticas (Lyford et al., 1995a). Además, la regulación de la actividad sináptica, tanto de depresión como de excitación, depende de Arc. Su rápida expresión interactúa con la maquinaria endocítica, como dinamina y endofilina, promoviendo la internalización de los receptores AMPA y modulando negativamente la plasticidad sináptica (Chowdhury et al., 2006; Diering, Gustina, & Huganir, 2014).

El gen Arc se transcribe en neuronas que forman parte de redes neuronales estables. La proteína de Arc tiene una dinámica temporal inducida por el comportamiento después de la exploración de entornos nuevos en el hipocampo (Ramírez-Amaya, V. et al, 2005), y también después de la estimulación luminosa en la corteza visual (Wang et al., 2006). En el hipocampo y células parietales, los niveles de ARNm y proteína están correlacionados en un lapso entre 30 min y 2 h, obteniendo su pico de expresión en este intervalo de tiempo tras la tarea de comportamiento. Posteriormente, hay una segunda ola de expresión de proteínas en el intervalo de 8 a 24 horas, notablemente específica de células previamente activadas. La expresión de la proteína Arc es dependiente de actividad, tiene un pico de actividad y vuelve a niveles basales (Ramírez-Amaya et al, 2005)

En el contexto del programa genético inducido por el aprendizaje, Arc (mRNA y proteína) emerge como un sistema crucial para la plasticidad sináptica a largo plazo y la consolidación de la memoria. La formación de circuitos de memoria se postula mediante la activación específica de neuronas durante el aprendizaje, las cuales, a través de mecanismos de plasticidad sináptica, contribuyen a la creación del engrama de memoria. La síntesis de proteínas *de novo* a partir de un programa de expresión génica único en estas neuronas es fundamental para la consolidación y almacenamiento de la memoria. La expresión dinámica de Arc está estrechamente ligada al aprendizaje *in vivo*, participando en la regulación del tráfico del receptor de glutamato AMPA modulando así la fuerza sináptica. La pérdida de Arc en ratones knockout se asocia con déficits cognitivos y la incapacidad para aprender de la experiencia visual (McCurry et al., 2010). Además, Arc se distingue por su capacidad de autoensamblaje en partículas esféricas similares a cápsides retrovirales, lo que le permite transportar material genético a células receptoras. Su origen evolutivo a partir de un dominio Gag retrotransposón Ty3-Gypsy también es notable, conservando la topología de una proteína Gag retroviral, lo que le permite esta curiosa capacidad de autoensamble (Myrum, et al, 2022). Esta proteína tiene la capacidad de formar también dímeros y heterodímeros, con múltiples funciones

diferentes asociadas a la plasticidad sináptica (Eriksen & Bramham, 2022). Además, se ha observado que la proteína Arc tiene la capacidad de mediar una forma única de comunicación intercelular al formar cápsides similares a virus, permitiendo la transferencia de ARNm de Arc entre neuronas, revelando una función conservada de oligomerización y transporte de proteínas Gag. Este fenómeno, aún no totalmente comprendido, destaca el papel de Arc como efector clave en la transformación de experiencias en cambios duraderos en el cerebro (Hantak et al., 2021).

Degradación de la proteína Arc

La proteína Arc es principalmente degradada por la ubiquitina ligasa E6 (E6AP), codificada por el gen Ube3A, que marca la proteína para su descomposición. En neuronas knock-out del gen Ube3A, se ha observado un aumento en los niveles de Arc (Kühnle et al., 2013). Este incremento causa una disminución en la capacidad cognitiva debido a la relación entre la actividad de Ube3A y la expresión de receptores AMPA. La pérdida de función de Ube3A resulta en una reducción de receptores AMPA debido a la sobreexpresión de Arc, que regula el tránsito de estos receptores (Greer et al., 2010). Además, la mutación de los sitios específicos de Arc que son sensibles a la ubiquitinación modifican la capacidad de Arc para regular la fuerza sináptica, resultando en problemas de aprendizaje (Wall et al., 2018). Otras moléculas implicadas en la degradación de la proteína Arc es GSK3 α/β , cinasas de serina-treonina tónicamente activas pero reguladas también por actividad neuronal. Estas cinasas limitan la expresión de Arc y su efecto sobre la morfología de las espinas dendríticas al regular la degradación de Arc (Gozdz et al., 2017). La expresión de la proteína Arc es dependiente también del tiempo de estimulación, alcanza un punto máximo después de 1-2 h del desencadenante y vuelve a niveles basales apenas pasadas 4 h gracias a los mecanismos descritos (Soulé et al., 2012).

Arc en la plasticidad de la corteza visual

En la corteza visual, Arc regula la plasticidad sináptica dependiente de la actividad y la experiencia visual. La proteína Arc se expresa en las neuronas corticales en respuesta a diferentes estímulos visuales y modula la fuerza y la densidad de las sinapsis entre las neuronas (McCurry, C. L et al, 2010), modula la competencia entre las entradas talamocorticales (dando especificidad a las señales) y mantiene el equilibrio entre la potenciación y la depresión sináptica (Wang, K. H. et al, 2006). La proteína Arc es necesaria para el desarrollo y el refinamiento de las conexiones talamocorticales, así como para la plasticidad ocular dominante y la plasticidad homeostática en la corteza visual (Gao, M. et al, 2010), y la proteína Arc al ser transfectada a la corteza visual con virus en ratones KO para el gen de Arc puede restaurar la plasticidad juvenil en esta región del cerebro (Jenks, K. R. et al, 2017).

Arc en la plasticidad del núcleo geniculado lateral

Un estudio reciente realizado por Fan y cols. (2023) encontró la expresión diferencial de la proteína Arc en el NGL en un modelo felino de ambliopía. La ambliopía es una enfermedad coloquialmente conocida como ojo perezoso, en el que uno de los ojos esta principalmente encargado de la visión mientras que el otro responde pobremente. Se privo a los animales de experiencia visual de uno de sus dos ojos, y tras 2 semanas de privación se valoró la expresión diferencial de la proteína Arc en el NGL de estos, encontrando una asociación entre la reducción de esta proteína, la privación de la experiencia visual y la apoptosis de las células nerviosas en este núcleo.

Expresión de Arc en la retina

Por otro lado, sobre Arc en la retina existe muy poca evidencia, y es contradictoria. El primer grupo de investigación en buscar esta proteína en la retina fue el de Pinaud y cols. (2002). A través de inmunofluorescencia detectaron que, en condiciones

constantes de iluminación, proteínas asociadas a plasticidad como NGFI-A y Arc tienen una expresión diferencial en la retina de ratones expuestos durante 3 semanas a un ambiente enriquecido. Este aumento fue concordante con la expresión de genes tardíos GAP-43 y sinapsina 1. Centralizando en Arc, detectaron que había una expresión de la proteína principalmente en las capas plexiformes, sin reportar señal en ninguna capa nuclear de la retina (Pinaud, R., et al, 2002). Más recientemente, el proyecto GENSAT, un atlas de expresión genética disponible públicamente del cerebro adulto y en desarrollo de ratones, identifica la expresión de distintos genes a través de ratones transgénicos BAC-EGFP. Este proyecto detectó la presencia de Arc en células amacrinas (capa nuclear interna) y en la capa de células ganglionares, además de reportar que en axones es indetectable (Siegert, S., et al, 2009).

Planteamiento del problema

La plasticidad retiniana es un fenómeno relevante para la función visual, aunque al momento no se reconocen completamente los mecanismos moleculares y celulares involucrados en este proceso. Arc es un regulador maestro de la plasticidad sináptica en el cerebro. En la corteza visual y el NGL se reconoce su relevancia por su participación en cambios plásticos. Elucidar/entender la dinámica de la expresión de Arc en la retina y evaluar si su expresión es inducible, podría identificar un nuevo sustrato molecular de la plasticidad en la retina que sea de utilidad por sí mismo, como mecanismo fundamental de la fisiología y como blanco terapéutico potencial en trastornos neurodegenerativos.

Hipótesis

La proteína Arc exhibe una dinámica de expresión acoplada a la actividad neuronal inducida por estimulación lumínica en la retina de ratas adultas.

Objetivo general

- Describir la dinámica de inducción de la expresión de la proteína Arc en la retina

Objetivos específicos

- Identificar la expresión y localización de la proteína Arc en la retina a través inmunofluorescencia utilizando la técnica de aclaramiento de tejido (CLARITY) en un modelo experimental de privación/estimulación visual en ratas Wistar macho adultas.
- Caracterizar la cinética de la expresión de la proteína Arc en la retina inducida por un protocolo de privación/estimulación visual realizando un curso temporal utilizando Western Blot en ratas Wistar macho adultas.

Diseño experimental

Se privaron de experiencia visual a 32 ratas Wistar macho adultas de entre 4-6 meses de edad durante al menos 48 h. Los animales se organizaron de acuerdo con su condición de privación/estimulación lumínica, y el tiempo que transcurrió entre la estimulación lumínica y el sacrificio. Los grupos se definieron del siguiente modo:

- Ratas privadas de luz (0 h)
- Ratas estimuladas, divididas según el tiempo posterior a la iluminación:
 - o 1 h
 - o 1.5 h
 - o 2 h
 - o 4 h
 - o 8 h

La estrategia experimental involucró animales que fueron perfundidos y animales cuyos tejidos se obtuvieron en fresco, con la intención de realizar inmunofluorescencia en cerebros y retinas, además de Western Blot para caracterizar a través de un curso temporal la dinámica de expresión de la proteína Arc en la retina.

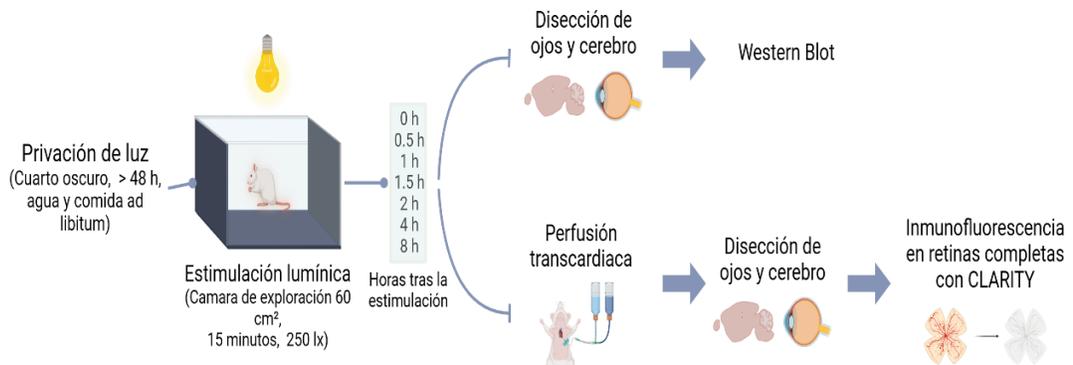


Figura 7. Esquemización del diseño experimental. Las 32 ratas Wistar macho adultas fueron divididas en los grupos descritos, sacrificadas y sometidas a la disección de los tejidos posterior a la perfusión transcardiaca o en fresco. Elaboración propia con BioRender.

Materiales y Métodos

Animales

Los procedimientos experimentales de esta tesis se realizaron utilizando ratas Wistar macho adultas de 4 a 6 meses de edad. Los procedimientos se llevaron a cabo siguiendo la Norma Oficial Mexicana para el uso y cuidado de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999), aprobados por el Comité Interinstitucional para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio (CICUAL) 0390-24 del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, ajustándose a las pautas de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) para el cuidado y uso de animales.

Estimulación visual

La privación de experiencia visual de las ratas se llevó a cabo colocándolas en un cuarto oscuro durante un mínimo de 48 h con agua y comida *ad libitum*. Las ratas fueron colocadas en una arena negra de 60 cm cúbicos, con una clave visual en una de sus paredes, expuesta a una fuente luminosa de 800 lúmenes colocada a 60 cm de la base de la arena. Se les permitió explorar libremente durante 15 minutos, al tiempo que su actividad fue grabada con una cámara Logitech C920 HD (Logitech, México). La intensidad lumínica en la arena fue variable asegurando siempre un promedio cercano a 250 luxes.

Obtención de muestras

Se indujo anestesia mediante pentobarbital sódico 6.3% a una concentración de 5 ml/kg (Pisabertal, México) y los cerebros fueron fijados mediante perfusión cardíaca con Buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.4 (PBS) seguida de paraformaldehído al 4% (Sigma-Aldrich, USA) en PBS. Los cerebros fueron retirados y transferidos a una solución de sacarosa al 30% (Sigma-Aldrich, USA) y preparados para su almacenamiento a -80°C.

Inmunofluorescencia

Los cerebros fueron embebidos en Tissue-Tek (VWR, Chicago, IL, USA) y cortados coronalmente en secciones flotantes de 50 μm de grosor utilizando un criostato Biobase BK-3000 (BIOBASE, China). Se utilizó PBS tamponado con Triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA) al .1% (PBS-T), para diluir los anticuerpos y lavar las secciones cerebrales entre incubaciones. Las secciones flotantes se lavaron durante 30 minutos, luego se colocaron en albúmina sérica bovina (BSA, Sigma-Aldrich, USA) al 5% durante 60 minutos, e incubaron a 4 °C en BSA al 5% Triton X-100 al 0.1% con alguno de los siguientes anticuerpos primarios utilizados en este trabajo: anticuerpo policlonal de conejo contra Arc (1:1000 o 1:500, Synaptic Systems, USA) (usado en inmunofluorescencia), anticuerpo monoclonal de ratón contra Arc (1:1000, Santa Cruz, USA) (usado para Western Blot), anticuerpo policlonal de ratón contra tirosina hidroxilasa (TH; 1:500, Santa Cruz, USA), anticuerpo monoclonal de ratón contra Brn3a (1:1000, Santa Cruz, USA), anticuerpo monoclonal de ratón contra vimentina (1:1000, Santa Cruz, USA). Se prepararon controles negativos sin anticuerpos primarios. Luego, las secciones se lavaron durante 60 minutos en PBS-T, seguido de una incubación a temperatura ambiente durante 2 horas en BSA al 5%, Triton X-100 al 0.1% con anticuerpos secundarios: inmunoglobulina G de cabra anti-ratón Alexa fluor 546 (1:1000, Thermo Fisher Scientific, USA) inmunoglobulina G de cabra anti-conejo Alexa fluor 488 (1:1000, Thermo Fisher Scientific, USA) o DAPI (Sigma Aldrich, USA). Las secciones se lavaron nuevamente y se montaron en portaobjetos.

Para el Western Blot, el cerebro se extrajo de las ratas decapitadas previamente anestesiadas con pentobarbital. Se disecaron el hipocampo y la corteza visual y fueron transferidas a buffer de lisis RIPA (Thermo Fisher Scientific, USA) para la posterior homogenización del tejido utilizando un sonicador de punta Sonics VCX-130 (Sonics & Materials, USA), 3 pulsos a una Amp 30% por 3 segundos cada uno. Se realizó la cuantificación de proteína total utilizando el kit Micro BCA de Thermofisher (Thermo Fisher Scientific, USA). Las muestras de proteína se cargaron en un gel SDS-PAGE (SDS, Bio-Rad, USA; TEMED, Bio Rad, USA; PSA, Santa Cruz, USA; Trizma base, Sigma Aldrich, USA) al 12% (p/v). La electroforesis

se realizó a 95 V durante 2 horas, cargando 15 ul de proteína por pozo. Se realizó la transferencia de las proteínas en el gel a una membrana de PVDF (GVS North America, USA) a través de electrotansferencia a voltaje constante 20 V 400 mA durante 2 h a 4°C. La membrana se bloqueó en una solución de TBS-BSA (Sigma-Aldrich, USA) al 5% durante 1 hora en agitación constante a temperatura ambiente. La membrana previamente bloqueada se incubó con el anticuerpo primario correspondiente diluido en solución bloqueadora durante 24 horas a 4°C. Posteriormente se realizó la incubación con el anticuerpo secundario correspondiente, inmunoglobulina G de cabra anti-conejo conjugada a Hrp (1:4000, Jackson ImmunoResearch, USA) o inmunoglobulina G de cabra anti-ratón conjugada a Hrp (1:4000, Jackson ImmunoResearch, USA). Se utilizó sustrato quimioluminiscente Santa Cruz para la detección en un fotodocumentador.

Obtención de retinas

La enucleación de los ojos se realizó utilizando unas pinzas curvas de 45°, cortando el ojo a nivel del nervio óptico, y trasladándolo a PBS o sacarosa. Posteriormente, el ojo se disecó utilizando pinzas curvas, pinzas rectas y tijeras de precisión bajo el microscopio estereoscópico en una solución de sacarosa al 5%. Se realizó un corte a nivel de la unión corneoescleral, siguiendo el corte alrededor de dicha unión para separar la cámara anterior de la cámara posterior del ojo, extrayendo luego la retina, la cual se resguardó en PBS a 4°C.

Inmunohistoquímica

En el proceso de preparación de tejidos para la inmunohistoquímica, se realizaron cuatro cortes uniformes alrededor de la retina, que luego se colocó plana en forma de trébol en un cuadrado de papel de filtro de nitrocelulosa. Posteriormente, se transfirió a una placa con paraformaldehído al 4% durante 1 hora, se lavó tres veces con PBS durante 5 minutos cada uno, y se incubó en A4P0 (Acrilamida (INVITROGEN, USA) 4%, 0.25% VA-044 (FUJIFILM, USA), PBS .1M) a 4 °C durante la noche. Luego, se cubrió con aceite vegetal (Sigma Aldrich, USA) y se

incubó a 40 °C durante 3 horas, seguido de tres lavados con PBS de 5 minutos cada uno, y se incubó en SDS (BIO-RAD, USA) al 10% a 40 °C durante dos días (cambiando el SDS al transcurrir el primer día). Posteriormente, se trasladó a PBS con Triton-X-100 al 0.1%, y se almacenó a 4 °C en PBST con azida de sodio (Santa Cruz, USA) o se pasó directamente a la inmunotinción.

En la etapa de inmunotinción, la retina se retiró del papel de filtro y se incubó en los anticuerpos primarios según fuera el caso (mencionados anteriormente) diluidos en una solución de bloqueo durante 2 días a 40 °C. Después, se realizaron cinco lavados en PBST al 0.1% de 1.5 horas cada uno, y se incubó con anticuerpos secundarios apropiados diluidos en solución de bloqueo durante 2 días a 40 °C. Al terminar dicha incubación, se realizaron cinco lavados de 1.5 horas cada uno en buffer fosfato 0.02 M. Posteriormente, se incubó en una solución de emparejamiento de índice de refracción basada en sorbitol (sRIMS; Sorbitol 70%, Sigma Aldrich, USA; Tween 20 0.1%, Bio-Rad, USA; Nan3 0.01%; buffer de fosfatos 0.02 M) durante la noche a 40 °C.

En la fase de montaje, la retina se colocó entre un cubreobjetos y una lámina de microscopio utilizando grasa de silicona. Se delimitó un cubreobjetos, se trazó el límite con grasa de silicona en la lámina, y se colocó la retina en el área delimitada. Se aplicó sorbitol-based Refractive Index Matching Solution (sRIMS), se cubre con un cubreobjetos y se presiona para evitar burbujas. Se añadieron separadores y se almacenaron las láminas a 4 °C hasta la obtención de imágenes en un microscopio confocal DMI 8 Confocal Stellaris (Leica Microsystems, USA). Las imágenes se adquirieron con los objetivos de 20x o 63 x. Se generaron cortes de 1 micrometro de grosor, y se realizaron representaciones tridimensionales o se generaron videos para representar la retina en todas sus capas, utilizando el software LAS-X (Leica Microsystems, USA).

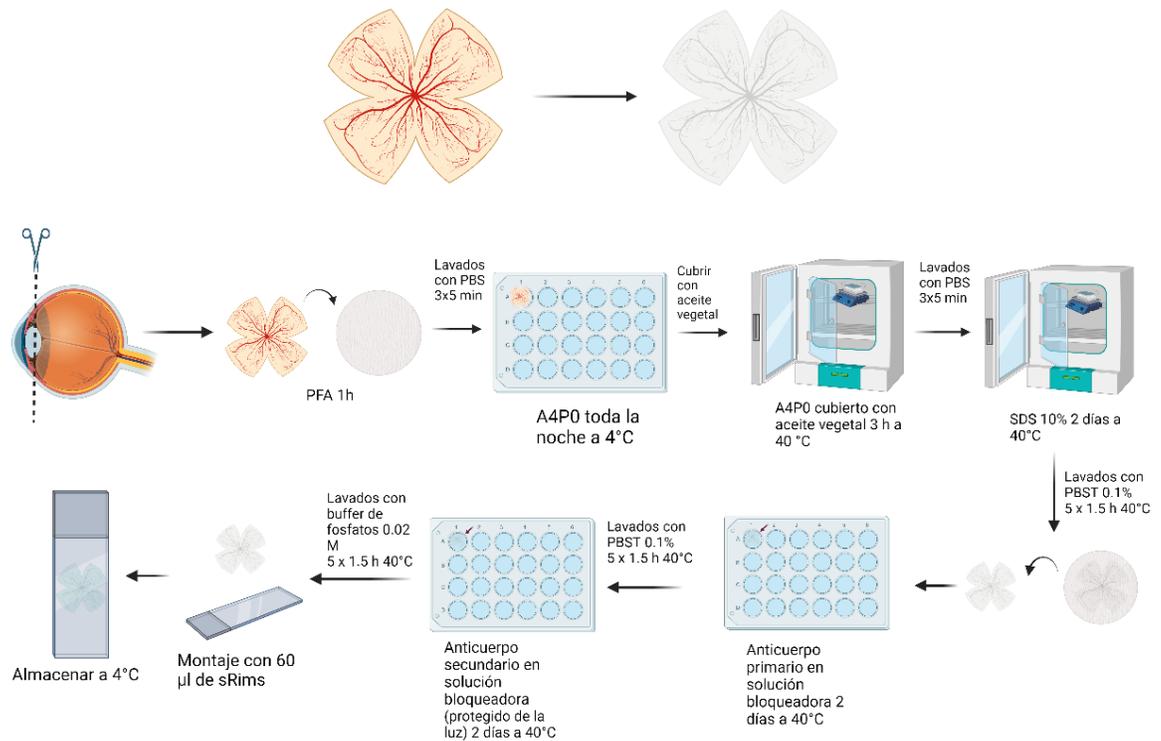


Figura 8. Esquema que muestra la técnica CLARITY en la retina. Elaboración propia con base en lo publicado por Alessio, E. J. et al, 2021.

Para el Western Blot, las retinas se extrajeron utilizando el método antes descrito y fueron transferidas a buffer de lisis RIPA para la posterior homogenización del tejido utilizando un sonicador de punta bajo el mismo protocolo de los cerebros. Se realizó la cuantificación de proteína total utilizando el kit Micro BCA de Thermofisher. Las muestras de proteína se cargaron en un gel SDS-PAGE al 12% (p/v). La electroforesis se realizó a 95 V durante 2 horas, cargando 15 ug de proteína por pozo. Se realizó la transferencia de las proteínas en el gel a una membrana de PVDF a través de electrotansferencia a voltaje constante 20 V 400 mA durante 2 h a 4°C. La membrana se bloqueó en una solución de TBST-BSA al 5% durante 1 hora en agitación constante a temperatura ambiente. La membrana previamente bloqueada se incubó con el anticuerpo primario policlonal de conejo contra Arc (1:2000) diluido en solución bloqueadora durante 72 horas a 4°C. Posteriormente se realizó la incubación con el anticuerpo secundario correspondiente: Se utilizo

sustrato quimioluminiscente (Santa Cruz, USA) para la detección en un fotodocumentador C-Digit (LICOR, USA).

Resultados

La proteína Arc se expresa en la retina

En una primera aproximación cualitativa, se encontró la expresión de la proteína Arc en la retina de ratas Wistar macho a través de inmunofluorescencia en cortes transversales de este tejido (n = 2). Se observaron señales esféricas positivas a Arc, en apariencia de somas celulares (Figura 9) de 12 a 20 micras de diámetro, sin precisar en qué capa de la retina, 2 h después de la estimulación lumínica.

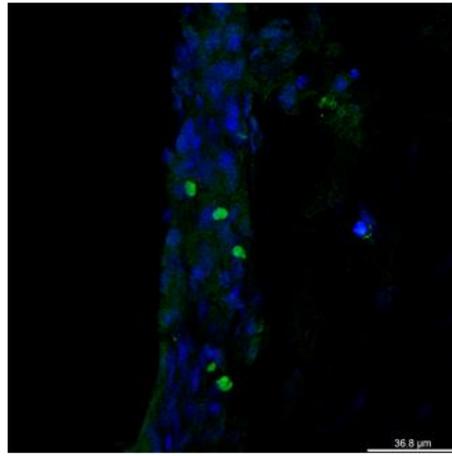


Figura 9. Inmunofluorescencia contra Arc en corte sagital de la retina. No se distinguen las capas de la retina por la calidad del tejido. Rata tras 2h de estimulación, se observan señales esféricas de entre 12-20 micras.

Además, en una aproximación también semicuantitativa, se buscó la expresión de la proteína Arc en la retina a través de WB (n=2). Detectamos señal positiva en el peso correspondiente para la proteína de interés (50 kDa) en este tejido, comparando contra controles positivos (corteza visual, Cvx y vesículas extracelulares, EVs), utilizando células sanguíneas como control negativo (Figura 10). Las muestras de Cvx y Ret se repitieron para estandarizar la cantidad de proteína a cargar en el Western Blot.

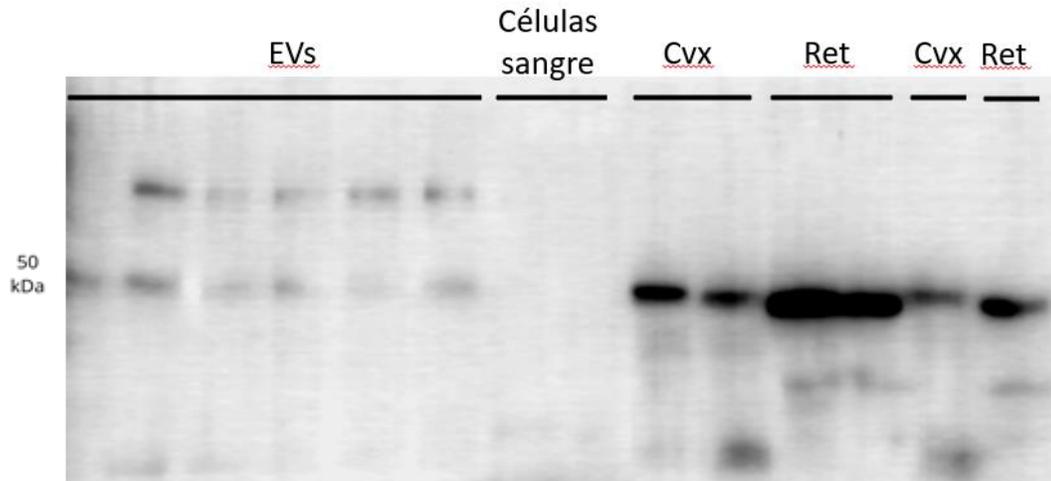


Figura 10. Western Blot de la expresión de Arc en corteza visual y retina de ratas bajo protocolo de estimulación. 6 carriles de vesículas extracelulares (EVs), 2 carriles de células sanguíneas (excepto eritrocitos), corteza visual (Cvx) y retinas (Ret). Obsérvense bandas con señal quimioluminiscente en el peso correspondiente para la proteína Arc.

Arc se expresa en la capa nuclear interna y la capa de células ganglionares de la retina

Para corroborar la ubicación anatómica de Arc en la retina, se realizó el protocolo de deslipidificación a la retina de los roedores en condiciones de privación lumínica y tras 2 h (pico máximo de expresión) de estimulación (n=8). Observamos la expresión (Figura 17) de la proteína, probablemente en la capa nuclear interna, en condiciones de privación lumínica (Figura 17 B) y tras la estimulación (Figura 17 C). Detectamos de forma consistente señales en cuerpos y proyecciones celulares, además de señal positiva para la proteína Arc en la capa de células ganglionares (Figura 18). El video adjunto en la figura complementaria 1 ([Video 1](#)) destaca señales positivas para Arc, con múltiples células activadas y proyecciones que parecen surgir desde capas más interiores (capa nuclear interna putativa) y llegan finalmente a la capa de células ganglionares.

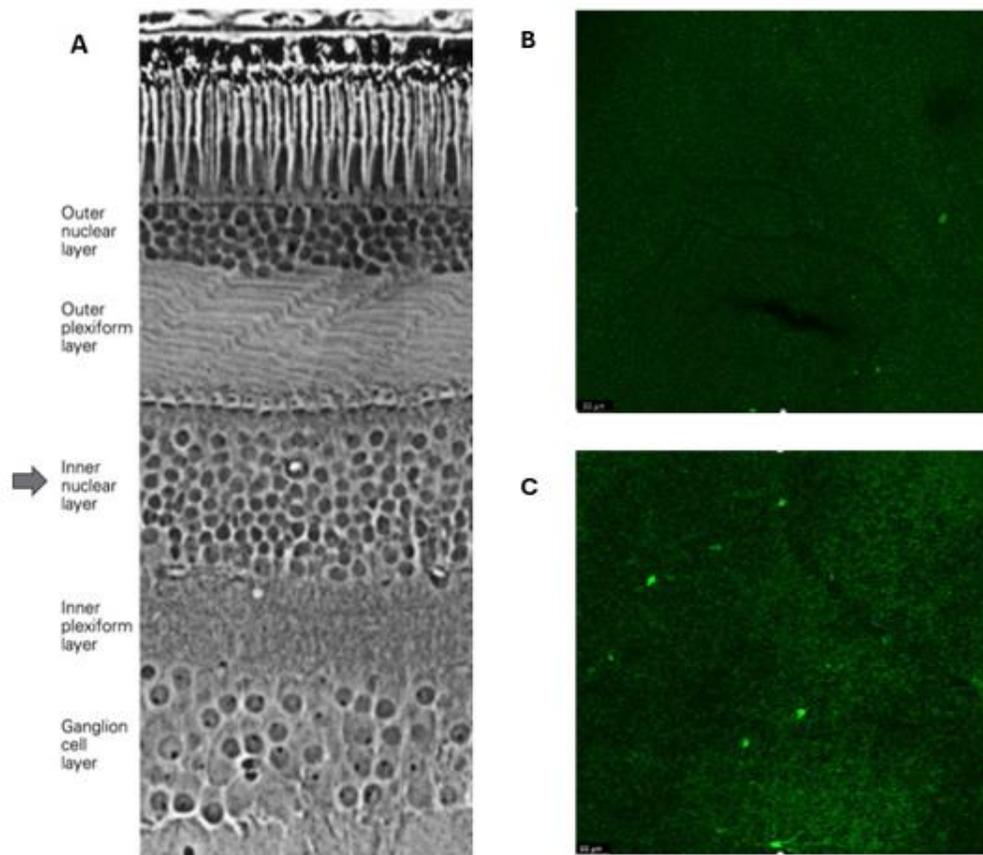
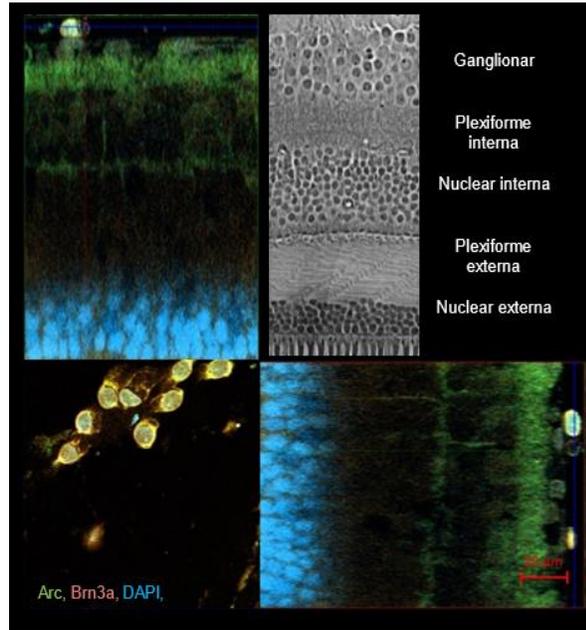


Figura 11. CLARITY en retinas de ratas perfundidas. Localización anatómica putativa por auto-fluorescencia de la señal de Arc en la retina A. Imagen de microscopia de luz extraída de Kandel et al, 2013. B. Imagen de microscopia confocal 20x en la retina de una rata privada de luz. C. Imagen de microscopia confocal 20x en la retina de una rata tras 2 h transcurridas desde la estimulación lumínica.

Para confirmar que la expresión de la proteína Arc es específica de estas capas en la retina, se utilizaron marcadores exclusivos para cada una de estas (n=3). Gracias al montaje completo de las retinas tras el aclaramiento, se realizó una reconstrucción tridimensional de la retina (Figura 13 A), que nos permite visualizar las capas de este tejido de la más externa (superior) a la más interna (inferior). Observamos señal positiva para Arc principalmente en la capa ganglionar y la capa nuclear interna, además de algunas proyecciones aparentes entre estas dos capas. Brn3a se utilizó como herramienta para marcar exclusivamente la capa de células ganglionares. Se observó la expresión específica de Arc en la capa ganglionar, encontrando expresión de proteína Arc, Brn3a y DAPI en algunas células de esta

capa (Figura 13 B). Por otro lado, se utilizó tirosina hidroxilasa (TH) como marcador específico para capa nuclear interna. (Figura 13 B). En la capa nuclear interna, se observó marcaje positivo de células que expresan Arc, y se encontraron algunas células que exhiben colocalización de Arc con TH (figura 14).

A



B

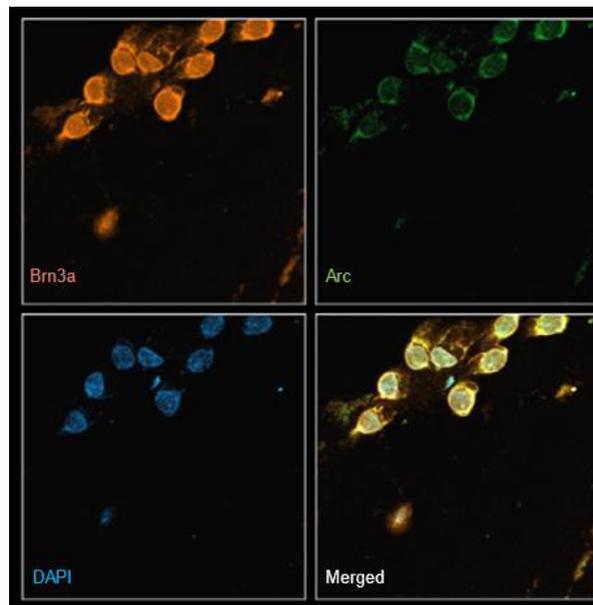


Figura 12. Expresión de Arc en la capa ganglionar de la retina. A. Vista ortogonal de la expresión de Arc en la retina. Se observa la expresión de Arc en la capa ganglionar y la capa nuclear interna. Imagen de microscopía de luz extraída de Kandel et al, 2013. B. Imagen de células en la capa ganglionar de la retina. Se observa distribución nuclear de Brn3a y DAPI, con Arc primordialmente en la periferia. Señal naranja Brn3a, verde Arc y azul DAPI.

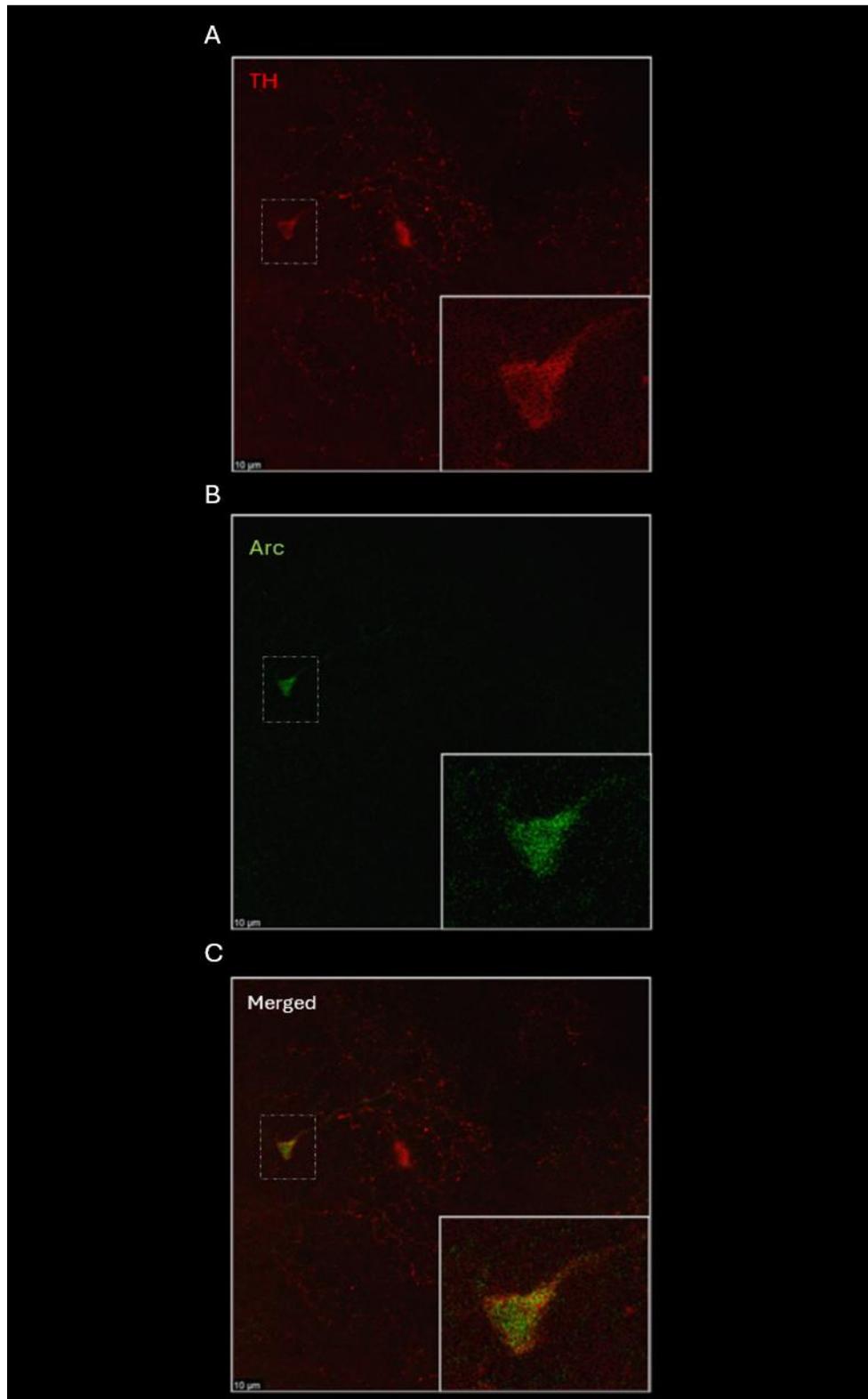


Figura 13. Expresión de Arc en la capa nuclear interna. A. TH. B. Arc C. Merged.

Inducción de Arc a través de la estimulación luminosa

En los animales correspondientes, la estimulación lumínica se realizó en una arena de libre exploración asegurando una intensidad lumínica promedio de 250 lx (Figura 15 A). Se observó que las ratas Wistar macho tienen una preferencia por permanecer más tiempo en los sitios menos iluminados de la arena (Figura 15 B), dada su naturaleza fotofóbica. Detectamos que los roedores ($n=20$), pasan consistentemente más tiempo en el sitio menos iluminados (Q1) en comparación con los demás (Anova de una vía, $F = 279.9$, $P < .0001$, Tukey post Hoc). Este resultado nos permite corroborar que los animales son capaces de percibir la luz del entorno donde están siendo estimulados.

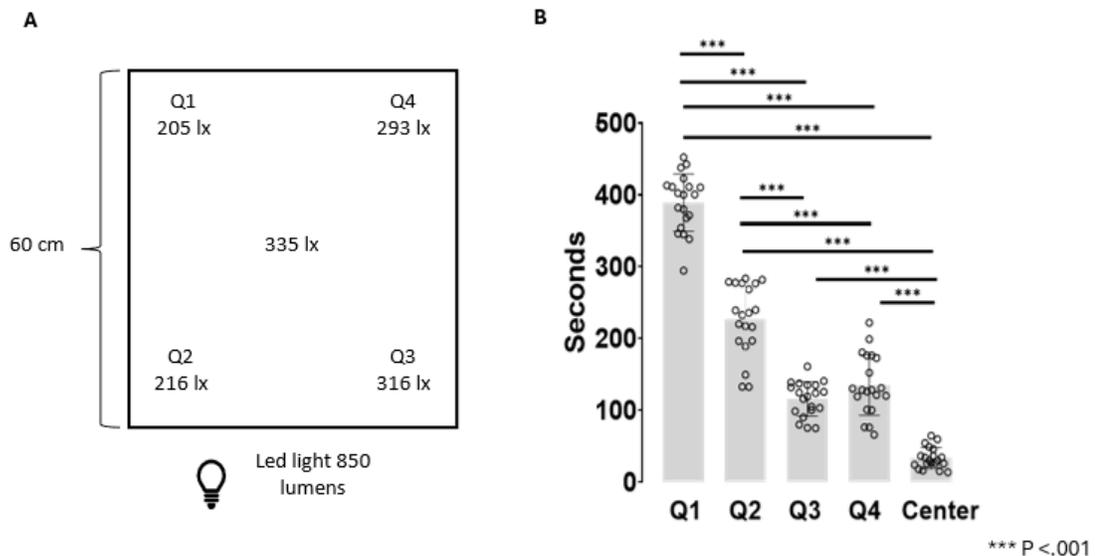


Figura 14. Conducta durante la estimulación luminosa. A. Representación de la iluminación en distintas partes de la arena. B. Tiempo en segundos que paso cada animal en cada zona de la arena. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre todas las zonas de la arena de comportamiento, siendo el sitio más concurrido también el menos iluminado. $n=20$. Anova de una vía, $f = 279.9$, $P < .0001$ tukey post-hoc.

Tras el protocolo de privación/estimulación luminosa (Figura 16 A), se perfundieron a las ratas ($n=10$), se extrajeron los cerebros y se valoró la expresión de la proteína Arc en la corteza visual para corroborar la eficiencia del protocolo en la activación de la vía visual. Se observó que el protocolo de estimulación activó la corteza visual (Figura 12 B) de forma consistente con los datos de la literatura, comparando la corteza de ratas privadas de luz contra aquellas sacrificadas 2 h posteriores a la estimulación luminosa (Figura 12 C). Encontramos un mayor número de células

positivas contra Arc tras 2 h de estimulación lumínica (T de Student, $P = 0.0020$, Tukey post hoc)

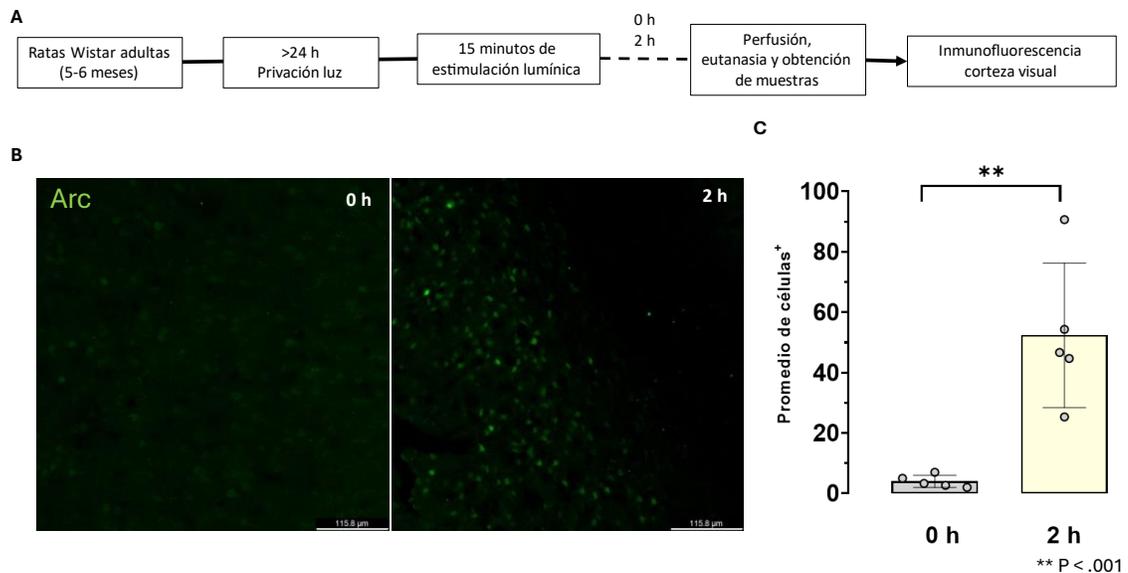


Figura 15. Expresión diferencial de Arc en la corteza visual primaria de ratas Wistar macho. A. Estrategia experimental B. Microfotografías obtenidas por microscopia confocal de Cvx primaria de rata completamente privada de luz (0 h) y 2 h tras la estimulación lumínica. C. Gráfica de cuantificación de la expresión de la proteína Arc en la Cvx tras la estimulación lumínica. Obsérvese el grado de actividad tras exponer a los roedores a luz, t de Student, $P = 0.002$, tukey post hoc.

Cinética de expresión de Arc en retina y corteza visual

Se realizó el curso temporal de expresión de la proteína Arc en la retina a través de Western Blot ($n=20$) considerando los siguientes tiempos: 0, 1, 1.5, 2, 4 y 8 h posteriores a la estimulación lumínica (Figura 17 A). Observamos una cinética de actividad (Figura 17 C) que cuenta con un pico de la expresión de la proteína Arc en la retina a las 2 h posteriores al protocolo de estimulación (Anova de una vía, $F = 7.383$, $P < 0.0011$, Tukey post hoc).

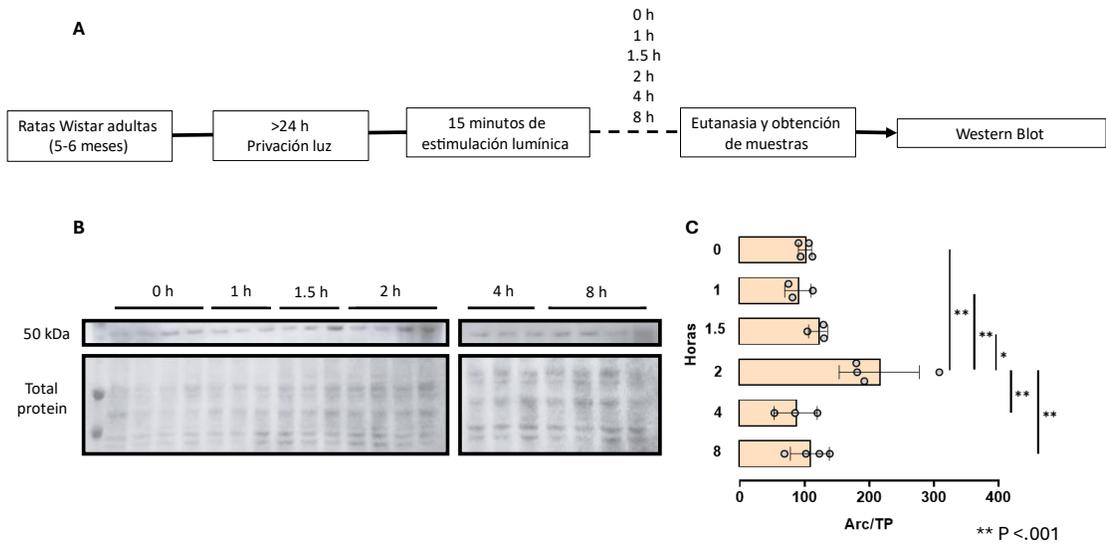


Figura 16. Cinética de expresión de Arc en la retina a través de Western Blot. A. Estrategia experimental. B. Western Blot de la retina de distintos individuos tras la estimulación visual a diferentes tiempos. C. Control de proteína total. D. Cuantificación de la señal de Arc corregida con la suma de la señal de la proteína total en la membrana. Se observaron diferencias estadísticamente significativas sobre la expresión de la proteína Arc tras 2 h transcurridas desde la estimulación lumínica. Anova de una vía, $P = 0.0011$, Tukey post-hoc.

Se realizó además el curso temporal de expresión de la proteína Arc en la corteza visual a través de western Blot en los mismos animales ($n=20$) considerando los mismos tiempos posteriores (Figura 17 A) a la estimulación lumínica. De igual forma, observamos una cinética de actividad (Figura 18 C) con un pico de expresión a las 2 h tras la estimulación (Anova de una vía, $F = 2.563$, $P = 0.0926$, Tukey post hoc), tal como se ha reportado en la literatura.

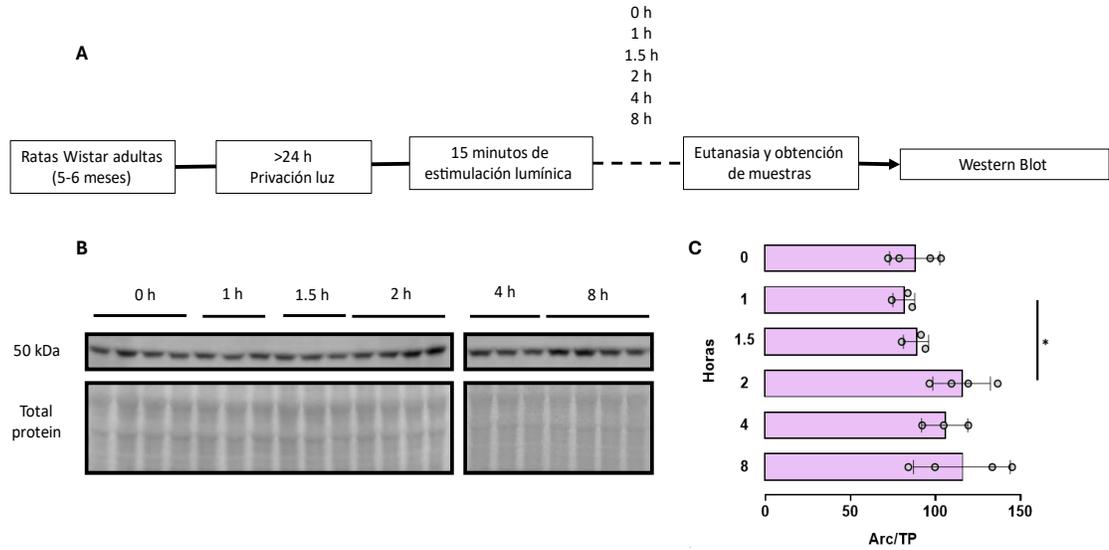


Figura 17. Cinética de expresión de Arc en la corteza visual a través de Western Blot. A. Estrategia experimental. B. Western Blot de la corteza visual de distintos individuos tras la estimulación visual a diferentes tiempos. C. Control de proteína total. D. Cuantificación de la señal de Arc corregida con la suma de la señal de la proteína total en la membrana. Se observaron diferencias estadísticamente significativas sobre la expresión de la proteína Arc tras 2 h transcurridas desde la estimulación lumínica. Anova de una vía, $P = 0.0926$, tukey post-hoc.

Discusión

En el presente estudio encontramos que la proteína sináptica Arc muestra una expresión inducible tras la activación de la retina en respuesta a la estimulación con luz en un modelo de privación/estimulación. Observamos que su cinética de expresión es consistente con la de otras regiones del SNC, como la corteza visual (Wang et al., 2006) y el hipocampo (Ramírez-Amaya et al., 2005). Lo anterior refuerza la idea de que esta proteína tiene un rol particular en la plasticidad de la retina en respuesta a los cambios lumínicos del entorno. Los resultados de este proyecto permiten postular a la expresión de Arc como un posible marcador para evaluar los cambios plásticos que ocurren en este tejido y como un blanco de estudio para entender la regulación de la conectividad de la retina en condiciones fisiológicas y patológicas.

La plasticidad retiniana se ha presentado como una propiedad limitada en tanto la capacidad retiniana de reestructurar sus circuitos en respuesta a cambios del entorno tales como la entrada de luz, ya que la retina es un tejido muy estable durante el curso de la vida (Strettoi et al., 2022). Hemos detectado la localización específica de la expresión de Arc en la retina. Esta proteína aparece en la capa nuclear interna y la capa de células ganglionares en respuesta a la estimulación lumínica. En la literatura se ha reportado la presencia de la proteína Arc en la retina en varios modelos murinos. En un estudio en ratas Wistar expuestas a entornos enriquecidos, la proteína se detectó en las capas plexiformes (Pinaud et al., 2002). Utilizando ratones transgénicos Arc-GFP, en el atlas de expresión génica en la retina de la GENSAT, se reportó la presencia de la proteína en la capa nuclear interna y la capa ganglionar (Siegert et al., 2009, 2012). Es la primera vez que se detecta la proteína Arc en estas últimas 2 capas de la retina de ratas Wistar en condiciones de privación/estimulación lumínica utilizando la técnica de aclaramiento de tejidos (CLARITY). Esta herramienta nos ha permitido corroborar la expresión específica de Arc en células de la capa nuclear interna y la capa ganglionar y,

además, nos ha permitido observar proyecciones neuronales de la capa nuclear interna a la ganglionar. Estos hallazgos son consonantes con los datos en la literatura y la expresión postsináptica de Arc, probablemente presente en los circuitos activados de forma posterior a la estimulación lumínica.

Si bien este trabajo sugiere fuertemente la expresión de Arc exclusiva en dos capas de la retina, cabe recordar la enorme diversidad neuronal en este tejido. Investigaciones posteriores podrían indagar sobre el fenotipo específico de las células que expresan Arc, lo cual podría darnos una mayor precisión sobre el rol que tiene esta proteína en la retina. En este trabajo, utilizamos TH como marcador de la capa nuclear interna, y detectamos la expresión de la proteína Arc en células que expresan TH. Esto podría ir ligado al punto anterior ya que parece que Arc se expresa en células dopaminérgicas de la capa nuclear interna, que muy probablemente son células amacrinas (Dacey, 1990). Este estudio abre la puerta a considerar el rol de células específicas en la plasticidad retiniana mediada por Arc, y refuerza la técnica de aclaramiento de tejidos (CLARITY) como una potente herramienta para visualizar las conexiones neuronales en la retina.

Detectamos que la proteína Arc es inducible tras al menos 48 h de privación visual, en distintos periodos de tiempo entre 0 y 8 h posteriores a 15 minutos de estimulación lumínica a una intensidad de 250 luxes (intensidad lumínica reportada que activa Arc en la corteza visual. La latencia entre los niveles basales de Arc tras la privación luminosa hasta alcanzar el pico máximo en su expresión fue de 2 horas. Transcurridas 4-8 horas posteriores a la estimulación, la proteína alcanza los niveles previos a la estimulación. La dinámica de Arc que hemos observado es muy similar a la que tiene en otros niveles del SNC (Ramírez-Amaya et al., 2005; Wang et al., 2006b), tanto en la latencia al pico máximo como en su recuperación a niveles basales. Es muy importante que Arc tenga una activación transitoria, ya que una presencia prolongada en las sinapsis activas culmina en alteraciones en la plasticidad (Greer et al., 2010; Kühnle et al., 2013) y problemas en el

aprendizaje/memoria (Wall et al., 2018). En el envejecimiento, una acumulación de Arc y un déficit en su degradación se asocian con deterioro cognitivo (Fletcher et al., 2014). Observar que Arc tiene una dinámica de expresión similar, con un pico específico en condiciones fisiológicas nos hace pensar que muy probablemente, la cinética de esta proteína en este tejido también está alterada en el envejecimiento o en condiciones patológicas.

La expresión de la proteína y el mRNA de Arc se ha utilizado como un marcador útil para identificar las neuronas activas y su vinculación con alguna función específica (Link et al., 1995; Lyford et al., 1995). Un estudio (Fujita et al., 2020) demostró la expresión diferencial de Arc en la retina de ratones en respuesta a un estímulo luminoso, pero no como un agente involucrado en la plasticidad retiniana, sino más bien, como una herramienta para detectar la activación neuronal en respuesta a actividad lumínica. Históricamente, se ha utilizado a Arc (gen, mRNA, y proteína) como una herramienta en neurociencias por su gran regulación, su expresión exclusiva en los circuitos activados y su cualidad de gen inmediato temprano (Guzowski et al., 1999; Kawashima et al., 2013). En su estudio, Fujita y cols. (2020) detectaron cambios en la actividad de las células ganglionares en respuesta a la lesión del nervio óptico. Sin embargo, más allá de ser solamente una herramienta para evaluar actividad, consideramos en este trabajo las capacidades de la proteína para modificar la estructura y función de las sinapsis en respuesta a distintos estímulos. Se reconoce que Arc es un regulador maestro de la plasticidad sináptica (Bramham et al., 2008) y un efector molecular asociado a múltiples vías de señalización (Nikolaienko et al., 2018). En el contexto de la vía visual, se sabe que Arc modula la plasticidad en respuesta a la experiencia en la corteza visual, a tal grado que cuando no está presente (ratones KnockOut), la corteza visual no sufre cambios relacionados con la dominancia ocular (McCurry et al., 2010). Se ha visto que la proteína Arc permite restaurar la plasticidad a un estado juvenil en ratones adultos, después de ser transfectada a través de vectores virales en esta región del SNC (Jenks et al., 2017). Observar que Arc es inducible en la retina es el primer

paso para valorar sus cambios en este tejido ahora en nuevos modelos, como el envejecimiento, la patología o el desarrollo, y así enriquecer el conocimiento sobre la plasticidad retiniana, fenómeno ampliamente implicado en distintas afecciones del ser humano. Investigaciones posteriores que indaguen sobre como restaurar la actividad de Arc en la retina, como monitorearla y modularla podrían ayudar a mejorar múltiples problemas de salud ocular y, por tanto, incidir en la calidad de vida de millones de personas.

Conclusiones

La expresión de la proteína Arc en la retina es inducible por la experiencia visual y exhibe una dinámica temporal con un pico máximo a las 2 h en el modelo de privación/estimulación lumínica en ratas Wistar macho adultas. Esta expresión tiene una especificidad anatómica, en la capa de células ganglionares y la capa nuclear interna en la retina. Estos resultados son una primera aproximación al papel de Arc en este tejido y abren una serie de preguntas acerca del papel de esta proteína en contextos de desarrollo, envejecimiento y enfermedad.

Figuras complementarias

Fig. complementaria 1. (Video 1) Microscopia confocal 20x de la retina de una rata Wistar macho adulta 2 h después de la estimulación lumínica. El video comienza desde la capa nuclear interna Obsérvese la señal en los cuerpos nucleares y las proyecciones. Se visualiza una proyección que comienza en la parte izquierda del cuadro y llega hasta una marca específica en la capa ganglionar putativa por fluorescencia. (también disponible en: <https://youtube.com/shorts/yeQ5JvHYHU>)

Referencias

- Alessio, E. J., & Zhang, D. Q. (2021). Immunostaining of Whole-Mount Retinas with the CLARITY Tissue Clearing Method. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (169), e62178.
- Boron, W. F., & Boulpaep, E. L. (2016). *Medical physiology E-book*. Elsevier Health Sciences.
- Citri, A., & Malenka, R. C. (2008). Synaptic Plasticity: Multiple Forms, Functions, and Mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, 33(1), Article 1.
<https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301559>
- Bramham, C. R., Worley, P. F., Moore, M. J., & Guzowski, J. F. (2008). The Immediate Early Gene Arc/Arg3.1: Regulation, Mechanisms, and Function. *Journal of Neuroscience*, 28(46), Article 46.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3864-08.2008>
- Dacey, D. M. (1990). The dopaminergic amacrine cell. *Journal of Comparative Neurology*, 301(3), 461-489. <https://doi.org/10.1002/cne.903010310>
- Eriksen, M. S., & Bramham, C. R. (2022). Molecular physiology of Arc/Arg3.1: The oligomeric state hypothesis of synaptic plasticity. *Acta Physiologica*, 236(3), e13886. <https://doi.org/10.1111/apha.13886>
- Fan, H., Wang, Y., Zou, Y., Song, W., Xie, J., Tang, X., & Chen, S. (2023). ARC/Arg3.1 expression in the lateral geniculate body of monocular form deprivation amblyopic kittens. *BMC Ophthalmology*, 23, 3.
<https://doi.org/10.1186/s12886-022-02757-5>
- Feller, M. B. (2003). Visual System Plasticity Begins in the Retina. *Neuron*, 39(1), 3-4.
[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00399-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00399-4)
- Fletcher BR, Hill GS, Long JM, Gallagher M, Shapiro ML, Rapp PR. A fine balance: Regulation of hippocampal Arc/Arg3.1 transcription, translation and degradation in a rat model of normal cognitive aging. *Neurobiol Learn Mem*. 2014 Nov;115:58-67. doi: 10.1016/j.nlm.2014.08.007. Epub 2014 Aug 23. PMID: 25151943; PMCID: PMC4250373.

- Fujita, K., Nishiguchi, K. M., Sato, K., Nakagawa, Y., & Nakazawa, T. (2020). *In vivo* imaging of the light response in mouse retinal ganglion cells based on a neuronal activity-dependent promoter. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 521(2), 471-477. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.10.155>
- Gozdz, A., Nikolaienko, O., Urbanska, M., Cymerman, I. A., Sitkiewicz, E., Blazejczyk, M., Dadlez, M., Bramham, C. R., & Jaworski, J. (2017). GSK3 α and GSK3 β Phosphorylate Arc and Regulate its Degradation. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00192>
- Guyton, A., C., & Hall, M. E. (2020). *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology* (14th ed.). Elsevier.
- Guzowski, J. F., McNaughton, B. L., Barnes, C. A., & Worley, P. F. (1999). Environment-specific expression of the immediate-early gene Arc in hippocampal neuronal ensembles. *Nature Neuroscience*, 2(12), 1120-1124. <https://doi.org/10.1038/16046>
- Hantak, M. P., Einstein, J., Kearns, R. B., & Shepherd, J. D. (2021). Intercellular Communication in the Nervous System Goes Viral. *Trends in Neurosciences*, 44(4), 248-259. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.12.003>
- Hubel, D. H., & Wiesel, T. N. (1959). Receptive fields of single neurones in the cat's striate cortex. *The Journal of Physiology*, 148(3), 574-591.
- INEGI (2020). Censo de población y vivienda 2020. Consultado el 26 del 07 de 2024 de https://www.inegi.org.mx/contenidos/productos/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/nueva_estruc/702825197520.pdf
- Jenks, K. R., Kim, T., Pastuzyn, E. D., Okuno, H., Taibi, A. V., Bito, H., Bear, M. F., & Shepherd, J. D. (2017). Arc restores juvenile plasticity in adult mouse visual cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(34), Article 34. <https://doi.org/10.1073/pnas.1700866114>
- Kawashima, T., Kitamura, K., Suzuki, K., Nonaka, M., Kamijo, S., Takemoto-Kimura, S., Kano, M., Okuno, H., Ohki, K., & Bito, H. (2013). Functional labeling of

- neurons and their projections using the synthetic activity–dependent promoter E-SARE. *Nature Methods*, 10(9), 889-895. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2559>
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S. A., & Hudspeth, A. J. (2013). *Principles of Neural Science* (5.^a ed.). McGraw-Hill.
- Kandel, E. R., Koester, J. D., Mack, S. H., & Siegelbaum, S. A. (2021). *Principles of Neural Science* (6th ed.). McGraw Hill Professional.
- Kawashima, T., Kitamura, K., Suzuki, K., Nonaka, M., Kamijo, S., Takemoto-Kimura, S., Kano, M., Okuno, H., Ohki, K., & Bito, H. (2013). Functional labeling of neurons and their projections using the synthetic activity–dependent promoter E-SARE. *Nature Methods*, 10(9), 889-895. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2559>
- Korb, E., & Finkbeiner, S. (2011). Arc in synaptic plasticity: From gene to behavior. *Trends in Neurosciences*, 34(11), 591-598. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.08.007>
- Kühnle, S., Mothes, B., Matentzoglou, K., & Scheffner, M. (2013). Role of the ubiquitin ligase E6AP/UBE3A in controlling levels of the synaptic protein Arc. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(22), 8888-8893. <https://doi.org/10.1073/pnas.1302792110>
- Levin, L. A., Nilsson, S. F. E., Hoeve, J. V., Wu, S., Kaufman, P. L., & Alm, A. (2011). *Adler's Physiology of the Eye E-Book: Expert Consult - Online and Print*. Elsevier Health Sciences.
- Link, W., Konietzko, U., Kauselmann, G., Krug, M., Schwanke, B., Frey, U., & Kuhl, D. (1995). Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(12), Article 12. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.12.5734>
- Lyford, G. L., Yamagata, K., Kaufmann, W. E., Barnes, C. A., Sanders, L. K., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Lanahan, A. A., & Worley, P. F. (1995). Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron*, 14(2), Article 2. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90299-6](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90299-6)

- McCurry, C. L., Shepherd, J. D., Tropea, D., Wang, K. H., Bear, M. F., & Sur, M. (2010). Loss of Arc renders the visual cortex impervious to the effects of sensory experience or deprivation. *Nature neuroscience*, 13(4), 450-457. <https://doi.org/10.1038/nn.2508>
- Nikolaienko, O., Patil, S., Eriksen, M. S., & Bramham, C. R. (2018). Arc protein: A flexible hub for synaptic plasticity and cognition. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 77, 33-42. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.09.006>
- Peraza de Aparicio, C. X. (2023). Acciones en salud visual ante la presbicia en grupos vulnerables3. *Revista Bionatura*, 8(3), 68. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.03.68>
- Pinaud, R., Tremere, L. A., Penner, M. R., Hess, F. F., Barnes, S., Robertson, H. A., & Currie, R. W. (2002). Plasticity-driven gene expression in the rat retina. *Molecular Brain Research*, 98(1), 93-101. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(01\)00328-X](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(01)00328-X)
- Platón. (380 a.C./1997). *La República* (A. Flores, Ed. y Trad.). Editorial Gredos.
- Ramírez-Amaya, V., Vazdarjanova, A., Mikhael, D., Rosi, S., Worley, P. F., & Barnes, C. A. (2005). Spatial exploration-induced Arc mRNA and protein expression: Evidence for selective, network-specific reactivation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(7), Article 7. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4342-04.2005>
- Rao, V. R., Pintchovski, S. A., Chin, J., Peebles, C. L., Mitra, S., & Finkbeiner, S. (2006). AMPA receptors regulate transcription of the plasticity-related immediate-early gene Arc. *Nature Neuroscience*, 9(7), 887-895. <https://doi.org/10.1038/nn1708>
- Revista mexicana de oftalmología. (2022). Actualización desde la anatomía funcional y clínica del sistema visual: énfasis en la vía y la corteza visual. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2604-12272022000200071

- Siegert, S., Cabuy, E., Scherf, B. G., Kohler, H., Panda, S., Le, Y.-Z., Fehling, H. J., Gaidatzis, D., Stadler, M. B., & Roska, B. (2012). Transcriptional code and disease map for adult retinal cell types. *Nature Neuroscience*, *15*(3), 487-495. <https://doi.org/10.1038/nn.3032>
- Siegert, S., Scherf, B. G., Del Punta, K., Didkovsky, N., Heintz, N., & Roska, B. (2009). Genetic address book for retinal cell types. *Nature Neuroscience*, *12*(9), 1197-1204. <https://doi.org/10.1038/nn.2370>
- Soulé, J., Alme, M., Myrum, C., Schubert, M., Kanhema, T., & Bramham, C. R. (2012). Balancing Arc Synthesis, mRNA Decay, and Proteasomal Degradation: MAXIMAL PROTEIN EXPRESSION TRIGGERED BY RAPID EYE MOVEMENT SLEEP-LIKE BURSTS OF MUSCARINIC CHOLINERGIC RECEPTOR STIMULATION*. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(26), 22354-22366. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.376491>
- Strettoi, E., Di Marco, B., Orsini, N., & Napoli, D. (2022). Retinal Plasticity. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(3), 1138. <https://doi.org/10.3390/ijms23031138>
- Tian, N., & Copenhagen, D. R. (2003). Visual Stimulation Is Required for Refinement of ON and OFF Pathways in Postnatal Retina. *Neuron*, *39*(1), 85-96. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00389-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00389-1)
- Tomás de Aquino, S. (1274/2006). *Summa Theologica* (F. J. Ruiz de la Peña, Trad.). Biblioteca de Autores Cristianos.
- Wall, M. J., Collins, D. R., Chery, S. L., Allen, Z. D., Pastuzyn, E. D., George, A. J., Nikolova, V. D., Moy, S. S., Philpot, B. D., Shepherd, J. D., Müller, J., Ehlers, M. D., Mabb, A. M., & Corrêa, S. A. L. (2018). The Temporal Dynamics of Arc Expression Regulate Cognitive Flexibility. *Neuron*, *98*(6), 1124-1132.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.05.012>
- Wang, K. H., Majewska, A., Schummers, J., Farley, B., Hu, C., Sur, M., & Tonegawa, S. (2006a). In Vivo Two-Photon Imaging Reveals a Role of Arc in Enhancing Orientation Specificity in Visual Cortex. *Cell*, *126*(2), 389-402. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.038>

- Wang, K. H., Majewska, A., Schummers, J., Farley, B., Hu, C., Sur, M., & Tonegawa, S. (2006b). In Vivo Two-Photon Imaging Reveals a Role of Arc in Enhancing Orientation Specificity in Visual Cortex. *Cell*, 126(2), Article 2.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.038>
- Wei, H., Yao, Y., Zhang, R., Zhao, X., & Du, J. (2012). Activity-Induced Long-Term Potentiation of Excitatory Synapses in Developing Zebrafish Retina In Vivo. *Neuron*, 75(3), 479-489. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.05.031>
- World report on vision (2019). WHO Noncommunicable Diseases, Rehabilitation and Disability (NCD) Team, Europe, Copenhagen, Denmark. .
<https://www.who.int/publications/i/item/world-report-on-vision>