

## Biología molecular de la memoria: Un diálogo entre genes y sinapsis

Isabel A. Muzzio

*«...Por mi parte, yo desearía saber aún más sobre la memoria. ¿Qué es lo que nos permite recordar, qué carácter tiene o cuál es su origen?... ¿Pensamos nosotros que esto es... una clase de espacio dentro del cual las cosas que recordamos pueden ser transferidas como si se tratara de una clase de vasija?... ¿O pensamos que la memoria consiste en la huella de las cosas registradas en la mente? ¿Cuáles pueden ser los rastros de las palabras, de los objetos, más aún, cuál podría ser el espacio adecuado para la representación de semejante masa de material?».*

(Cicerón, Primera centuria a.C.)

### Introducción

Estas preguntas han permanecido vigentes hasta la actualidad y han inspirado a poetas, filósofos y científicos. Estos procesos son fascinantes porque atañen a una de las características más distintivas del ser humano: su habilidad para adquirir nuevas

ideas a través de la experiencia. El aprendizaje nos permite obtener nuevos conocimientos sobre el mundo que nos rodea, y la memoria nos otorga recordar ese conocimiento a través del tiempo. Casi todas nuestras ideas y valores los hemos aprendido, de manera que nosotros somos quienes somos por lo que hemos experimentado y recordado. Es por esta relevancia por lo que aún hoy nos hacemos las mismas preguntas que

**C**ontrariamente a lo que es norma en nuestra Revista —neutralidad y discreción en la valoración de los trabajos que en ella se publican—, nos permitimos resaltar la importancia de la aportación de la Dra. Muzzio. Pertenece al equipo investigador de Eric Kandel, director del Centro de Neurobiología en la Universidad de Columbia (N. York), debiendo subrayarse que Kandel —junto a Carlsson y Greengard— fue galardonado el 9 de octubre de 2000 con el Nobel de Medicina, como reconocimiento a su aportación en la biología molecular del aprendizaje y la memoria, haciendo justo énfasis sobre la plasticidad neuronal, que incluye refuerzo y desarrollo de sinapsis anexo a los procesos nucleares.

La Dra. Muzzio nos explica detalladamente los experimentos que han sido la base de sus hipótesis, hasta las investigaciones más recientes, incluso inéditas.

Cicerón se planteaba más de 2.000 años atrás. ¿Cuál es la esencia de la memoria? ¿Dónde se almacena esta vasta información? ¿Cuáles son los mecanismos por los que cierta información se deposita permanentemente?

En los últimos 30 años, la neurociencia ha avanzado mu-

cho, gracias sobre todo al progreso en áreas tales como fisiología y biología molecular. Los datos que se presentan en este trabajo nos ayudarán a vislumbrar las respuestas a las constantes preguntas que nos hacemos sobre la memoria.

Hay dos tipos generales de memoria. Por un lado, las memorias explícitas (declarativas) son recuerdos referentes a hechos y sucesos de nuestra vida relacionados con gen-

Palabras clave: Memoria explícita e implícita. Plasticidad sináptica. Serotonina. Glutamato.

Fecha de recepción: Abril 2001

Seminario Médico

Año 2001. Volumen 53, Número Especial. Págs. 100-114

tes, cosas y lugares. La estructura que ha probado ser fundamental para este tipo de memoria es el hipocampo: las lesiones del hipocampo producen incapacidad para formar nuevas memorias, dejando las del pasado relativamente intactas. Esto sugiere que el hipocampo sólo es necesario para la formación de nuevas memorias, pero no para el almacenamiento de la información una vez que ésta ha sido ya procesada por completo.

El segundo tipo de memoria involucra memorias implícitas (no declarativas), identificándose con el aprendizaje. Dentro de este grupo, incluimos memorias inconscientes de habilidades motoras y hábitos mediados por el striatum, el emparejamiento (asociación inconsciente de eventos) mediado por el neocórtex, el condicionamiento clásico (asociación inconsciente de dos estímulos) a cargo de amígdala o cerebelo y, finalmente, el aprendizaje no asociativo (habitación y sensibilización) a través de vías reflejas.

Por ser la memoria un proceso tan complejo, los investigadores han optado por estudiar sus propiedades usando dos sistemas reduccionistas que tratan de minimizar el número de variables implicadas para así obtener un mejor control del proceso.

El primero de ellos estriba en el empleo de invertebrados con sistemas nerviosos sencillos, lo que hace posible la identificación de neuronas específicas relacionadas con un determinado comportamiento del animal. El segundo sistema incluye la utilización de secciones de hipocampo, una preparación que mantiene el circuito básico de este órgano, preservando sus propiedades bioquímicas o biofísicas básicas.

Un sistema reduccionista es sumamente informativo porque resulta probable que los mecanismos de almacenamiento de la memoria estén conservados filogenéticamente. De este modo, el análisis molecular del aprendizaje, con independencia de lo simple que sea el animal o la tarea estudiada, es probable que revele mecanismos generales. En este sentido, vamos a mostrar da-

tos que indican que las formas más sencillas de aprendizaje (memoria implícita), estudiadas especialmente en invertebrados, comparten muchos mecanismos moleculares con las formas de aprendizaje y memoria estudiadas en mamíferos (memoria explícita).

#### Experiencias en Aplysia

La *Aplysia californica* (Fig. 1) es un molusco dotado de un sistema nervioso muy simple, con 20.000 células neuronales. Aunque *Aplysia* logra aprender muchos de los comportamientos importantes para la especie, su sistema nervioso es muy sencillo



Figura 1.

en comparación con los cien mil millones de neuronas del ser humano. Las células neuronales del molusco están agrupadas en 10 unidades anatómicas llamadas ganglios, cada una de las cuales consta de 2.000 células; de esta forma un comportamiento sencillo puede involucrar solamente unas 100 de ellas (Fig. 2). Esta enorme simplificación permite la identificación individual de las neuronas que subyacen a ciertos comportamientos específicos.

En el laboratorio de Eric Kandel empleamos cuatro criterios para usar este sistema reduccionista en el estudio de la memoria y el aprendizaje:

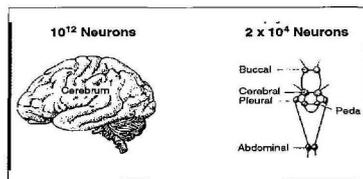


Figura 2.

1. Diseño del comportamiento susceptible de ser modificado por el aprendizaje.
  2. Definición del circuito neural de ese comportamiento a nivel celular.
  3. Localización dentro del circuito de las neuronas e interconexiones críticas para el aprendizaje.
  4. Análisis del mecanismo del aprendizaje primero a nivel celular y luego molecular.
- Aplysia posee en concreto una serie de «reflejos de escape» que determinan la contracción de la branquia y el sifón (Fig. 3). La estimulación suave del sifón produce la contracción del mismo y de la branquia. Con la estimulación repetida, este reflejo muestra habituación, es decir, una disminución de la respuesta debida a la repetición del estímulo. Contrariamente, si aplicamos un estímulo nocivo en la cola, el animal muestra sensibilización, contrayendo la branquia fuertemente y amplificando así la respuesta normal de este órgano. Finalmente, si apareamos la aplicación de un choque en la cola con un estímulo suave en el sifón, el animal ofrece el condicionamiento clásico,

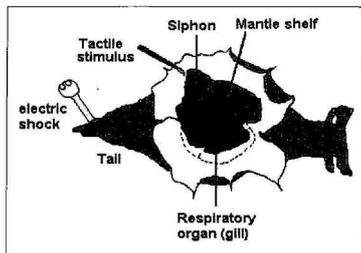


Figura 3.

aprendiendo a asociar un estímulo neutro con otro nocivo.

Para delinear los procesos moleculares que caracterizan a estas fases, nuestro laboratorio se enfocó en el proceso de sensibilización (Fig. 4). En este caso, cuando un estímulo nocivo es presentado al animal, éste aprende a reaccionar con más vigor no sólo a estímulo en cuestión, sino a otros aunque no sean dolorosos. Este proceso de fortalecimiento del reflejo de escape, llamado sensibilización, implica dos tipos de conexiones. De una parte, la aplicación de un choque eléctrico en la cola es capaz de activar las interneuronas de las vías anatómicas que forman conexiones heterosinápticas con las fibras y terminaciones que conectan sifón y branquia. De otra, un estímulo suave que incide sobre el sifón activa conexiones homosinápticas entre sifón y branquia.

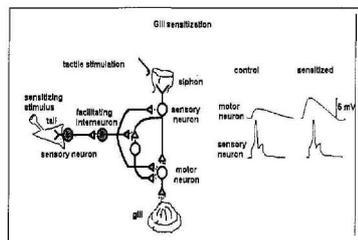


Figura 4.

Para analizar los mecanismos de sensibilización, debemos diseñar el circuito neuronal que subyace al comportamiento. El comportamiento del animal está mediado por el ganglio abdominal (Fig. 5). La ventaja de Aplysia es que sus células nerviosas son muy grandes: el soma neuronal de estas células está entre los mayores del reino animal, alcanzando las 1.000 micras de diámetro. Pueden además ser identificadas, de tal manera que es factible reconocerlas en distintos animales y experimentos. De esta forma, nosotros podemos retornar a la misma célula en cada animal de la especie y formar un mapa del circuito neural que

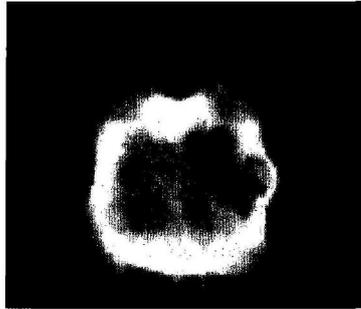


Figura 5.

subyace al comportamiento en términos de células concretas y específicas. El circuito estudiado muestra que el reflejo consta de conexiones monosinápticas entre 24 células sensoriales y 6 células motoras, y polisinápticas entre interneuronas.

Un punto importante para entender cómo funciona el aprendizaje y la memoria es que no sólo las células del circuito son constantes entre distintos animales de la especie, sino que también lo son sus interconexiones. Esto nos lleva a la primera pregunta relacionada con la memoria: ¿cómo puede un circuito neural fijo e invariable tener capacidad para modificarse con la experiencia? La respuesta está en su «plasticidad sináptica».

La plasticidad sináptica, de acuerdo a las experiencias en nuestro laboratorio, implica:

1. Que aunque las conexiones de un circuito neural son fijas, al fuerza de las conexiones que en él se integran puede variar.
2. Diferentes formas de aprendizaje pueden modular las mismas conexiones en formas opuestas. Por ejemplo, la habituación —una forma de aprendizaje en la que el animal aprende a ignorar las propiedades del estímulo en el sifón— implica un debilitamiento de las conexiones sinápticas entre las células sensoriales y las motoras, mientras que la sensibilización —proceso en el que nos enfocamos aquí y que lleva al animal a responder con más vigor a un estímulo neutro

porque ha sido sensibilizado o preparado por otro estímulo con propiedades nocivas— lleva a un fortalecimiento de esas mismas sinapsis.

3. Los mecanismos que subyacen a la persistencia del cambio sináptico son los mismos que se utilizan para el almacenamiento de las memorias.

En el esquema de la figura anexa (Fig. 6) se muestran en forma simplificada las conexiones involucradas en la sensibilización. El estímulo aplicado en la cola refuerza el reflejo de escape, activando un sistema modulador que contiene tres clases de interneuronas. Estas actúan sobre la célula sensorial, incluyendo sus terminales. Un solo estímulo procura un cambio pasajero en esta conexión y no depende de la síntesis de nuevas proteínas. En cambio, los estímulos repetitivos ocasionan un fortalecimiento persistente.

Para el estudio de la plasticidad sináptica, nuestro laboratorio se ha enfocado en la porción monosináptica del circuito por varias razones:

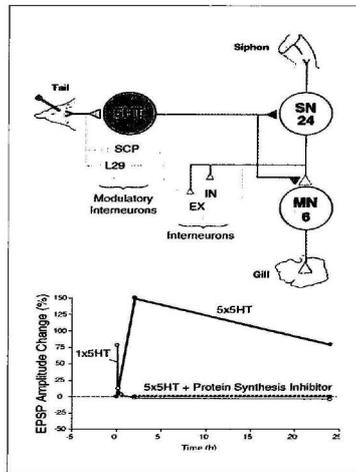


Figura 6.



El hecho de que existan activadores y represores a nivel nuclear indica que la consolidación de la memoria es un proceso altamente regulado. De este modo, para almacenar una memoria a largo plazo no sólo es necesario poner en marcha la maquinaria de los genes que participan en la facilitación, sino que al tiempo hay que inactivar los represores, los cuales crean así un umbral para que la información pueda ser almacenada.

Existen una serie de similitudes y diferencias entre memoria a corto y largo plazo. Son características comunes a ambas:

1. La memoria a corto y largo plazo de la sensibilización implican cambios en la fuerza sináptica de las conexiones.
2. En ambos procesos, el incremento de la fuerza sináptica entre la célula sensorial y la motora depende de un aumento en la cantidad de neurotransmisor liberado por la célula presináptica.
3. El mismo neurotransmisor (serotonina) es liberado por la estimulación del sifón después de una sola sesión o varias sesiones.
4. La cascada que involucra a cAMP y PKA es crítica para la memoria a corto y largo plazo.

Las diferencias entre ambos tipos de memoria estriban en:

1. La de largo plazo requiere expresión de genes, síntesis de nuevas proteínas y crecimiento de nuevas conexiones sinápticas.
2. En animales, los inhibidores de proteínas o de ARN mensajero (mARN) interfieren sólo la memoria a largo plazo.

Podemos ahora preguntarnos: a requerimiento del núcleo, ¿los cambios ocurren en toda la célula o la plasticidad muestra sólo modificaciones en la sinapsis que han sido estimuladas? Si es esto último verdad, ¿qué mecanismos utilizan las neuronas para que los productos de la transcripción encuentren aquellas sinapsis que han sido estimuladas?

A este respecto, Andrea Casadio modificó el sistema de cultivo de células de *Aplysia* co-cultivando neuronas sensitivas y moto-

ras. El 10% de aquéllas tiene axones bifurcados, que representan un sistema ideal para estudiar el fenómeno de la especificidad sináptica. Las células muestran inmunorreactividad a la serotonina, el neurotransmisor específico de las células sensoriales, y sus propiedades son idénticas a las de las células sensoriales que no se bifurcan. Estas neuronas forman sinapsis estables in vitro entre los días 5 y 6.

Estos experimentos fueron realizados aplicando localmente fármacos, en ramas neurales específicas. Tales sustancias se aplicaron con un sistema de baja presión en conjunción con tinturas, que permitían visualizar la difusión en las mismas. En todos los casos, la difusión quedó restringida al área que rodea la sinapsis estudiada. Cuando se aplicó un pulso de serotonina sobre una sinapsis, éste produjo un cambio rápido sólo en la sinapsis estimulada, que desapareció 24 horas más tarde. Cinco pulsos de serotonina produjeron un cambio duradero también restringido a la sinapsis estimulada. Estas experiencias demostraron pues que la estimulación es específica de la rama neural estimulada (*Fig. 10*).

La especificidad sináptica es dependiente de CREB1 y de la síntesis de nuevas proteínas. En efecto: utilizando el mismo sistema, cuando bloqueamos CREB1 con un anticuerpo específico anulamos este fenómeno. Del mismo modo, si agregamos un inhibidor de la síntesis de proteínas a la rama neural que recibe los 5 pulsos de serotonina, bloqueamos la especificidad si-

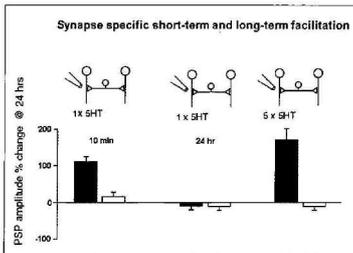


Figura 10.

náptica (Fig. 11). Estos resultados demuestran que la especificidad sináptica requiere CREB1 y síntesis de nuevas proteínas para ser estable. Las nuevas proteínas inducen el crecimiento de nuevas sinapsis y conexiones, un crecimiento que es específico de la sinapsis estimulada.

Sobre el modo en que ocurre este fenómeno, se pueden elaborar dos predicciones:

–los cinco pulsos de serotonina envían una señal al núcleo que activa CREB1, lo que origina la producción de proteínas o mensajeros que se envían solamente a la sinapsis estimulada; o bien

–la señal va al núcleo, activa CREB1 y todas las proteínas y/o mensajeros son enviados a todas las sinapsis de la célula, si bien sólo aquellas que de alguna manera son marcadas por la serotonina pueden utili-

se conoce como «captura sináptica», e implica que las proteínas sintetizadas por los factores de transcripción van a todas las sinapsis (Fig. 12). Además, estos resultados sugieren que los procesos a corto plazo tienen dos funciones:

–primero, cuando el proceso a corto plazo actúa solo, procura un fortalecimiento de la sinapsis breve, y específico de la sinapsis excitada;

–en segundo lugar, cuando ocurre en conjunción con la activación de CREB en otras partes de la célula, el proceso a corto plazo marca las sinapsis estimuladas para que éstas sean capaces de capturar las proteínas necesarias para el crecimiento sináptico (Fig. 13).

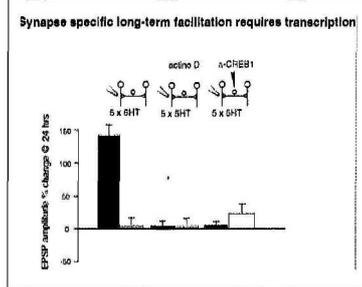


Figura 11.

zar estas proteínas para el crecimiento de nuevas conexiones.

Nuevamente, la preparación de las células de cultivo reconstituidas de *Aplysia* nos provee de un modelo para estudiar estas posibilidades. Andrea Casadio aplicó 5 pulsos de serotonina a una rama concreta e inmediatamente después sólo un pulso a otra. Los resultados indican que las dos ramas muestran facilitación. Esto ocurre porque la rama que recibe la estimulación débil captura los mensajeros o proteínas que han sido generados por la estimulación fuerte aplicada a la otra rama neural. Este proceso

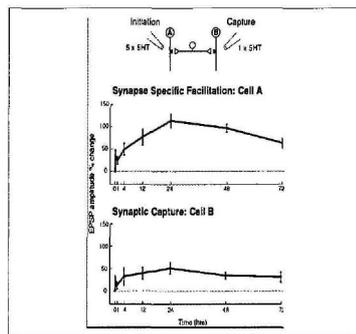


Figura 12.

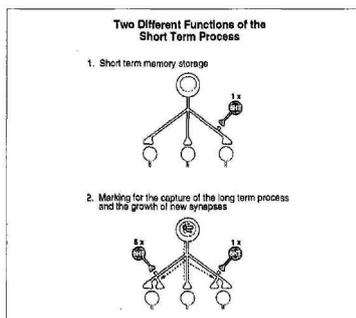


Figura 13.

Para examinar el proceso de marcación de sinapsis utilizamos el modelo de captura sináptica. Aquí examinamos dos posibilidades: PKA y síntesis local de proteínas. La primera posibilidad surgió al analizar el papel crucial que PKA desempeña en los procesos de plasticidad. La segunda se nos ocurrió en razón a que muchos estudios han demostrado que hay ribosomas y mRNA en las terminales postsinápticas, lo cual debe tener una funcionalidad importante. Así, los elementos necesarios para la síntesis de proteínas no solamente están en el soma perinuclear, sino también en las espinas dendríticas.

Los resultados de las experiencias que evaluaron estas hipótesis mostraron que agregando un inhibidor de PKA se bloquea el efecto de captura sináptica, lo que indica que la activación de la marca depende precisamente de PKA.

En un segundo experimento, investigamos los efectos del bloqueo de la síntesis local de proteínas en pruebas de captura y especificidad sináptica. Los resultados evidenciaron que la captura era insensible a rapamicina, un inhibidor parcial de la síntesis proteica, a las 24 horas del comienzo del experimento pero no a las 72 horas. Estos resultados indican que la síntesis de proteínas localmente es necesaria para la «estabilización» de la captura sináptica. De un modo similar, la aplicación de rapamicina en una sinapsis que fue excitada con 5 pulsos de serotonina no produjo efectos a las 24 horas, aunque sí a las 72. Rapamicina es un fármaco que bloquea la síntesis de proteínas que se supone participan en los procesos de crecimiento sináptico. Por lo tanto, observamos que la síntesis local proteínica sensible a rapamicina interfiere específicamente con la fase tardía de la facilitación. Por lo tanto, aunque inicialmente la marca permite la captura de proteínas o mensajes que producirán crecimiento, la estabilización de ese crecimiento requiere la fabricación local de proteínas.

Todos estos ensayos demuestran que en la plasticidad neuronal hay una combinación

de transcripción a nivel central y de traducción a nivel local, lo que nos lleva a preguntarnos:

—¿cómo se produce la integración de las señales?;

—¿cómo es que la acción sobre una terminación nerviosa afecta a otra terminación distante a través de su acción e influencia sobre el núcleo?

Las experiencias de captura sináptica representan el caso más sencillo. Para entender el proceso de integración se hace preciso incluir fenómenos de inhibición y observar cómo ambos, facilitación e inhibición, interactúan.

En este sentido, Steve Siegelbaum encontró hace pocos años que el péptido FMRFamida produce una acción inhibitoria justamente opuesta a la inducida por 5-HT (Fig. 14).

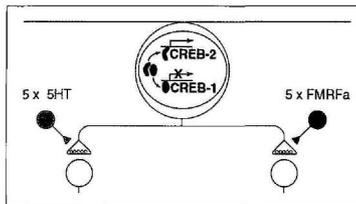


Figura 14.

Al igual que con 5-HT, pulsos repetidos de FMRFamida determinan inhibición a largo plazo, que depende de la síntesis de nuevas proteínas y reduce el número de terminales. Maurizio Giusteto continuó estos estudios, preguntándose: ¿muestra especificidad sináptica la inhibición a largo plazo? Así es, los resultados indicaron que la aplicación de FMRFamida a una terminal específica ocasiona inhibición sólo a esa rama. Más aún, esta forma de plasticidad es bloqueada cuando inhibimos el factor de transcripción CREB2, que actúa como represor de la facilitación a largo plazo. Se demostró además que bloqueando CREB2 en la célula sensorial un solo pulso de 5-HT produce facilitación a largo plazo. Esto significa que CREB2 interfiere con la acción de

CREB1 y que CREB2, además de actuar como represor, es capaz de activar genes por sí mismo.

Podemos preguntarnos ahora qué ocurre cuando dos estímulos, uno de facilitación y otro de inhibición, se aplican a dos ramas neurales independientes. Inmediatamente después de la aplicación de 5-HT y FMR-Famida a dos ramas neurales distintas, observamos que cada una de ellas induce localmente facilitación e inhibición, respectivamente. Sin embargo, 24 horas después se observa inhibición en ambas ramas: ello es así porque la inhibición activa CREB2, que bloquea CREB1.

Podemos resumir lo dicho hasta ahora señalando que se han presentado tres casos de integración sináptica que requieren transcripción a nivel nuclear y traducción a nivel local:

1. La aplicación de 5 pulsos de 5-HT en una rama produce facilitación en la rama neural estimulada e induce activación del factor de transcripción CREB1 para consolidar la facilitación.

2. La aplicación de 5 pulsos de FMR-Famida en una rama determina inhibición de la rama neural estimulada e induce activación del factor de transcripción CREB2 para consolidar la inhibición.

3. La utilización conjunta de 5 pulsos de 5-HT en una rama neural y otros 5 de FMR-Famida en otra rama, induce la activación de CREB2, que bloquea la acción de CREB1 y determina a la postre inhibición en ambas ramas neurales.

En conclusión, puede hablarse con propiedad, como reza el título del trabajo, de «un diálogo entre sinapsis y genes». La facilitación es dependiente de PKA, la cual activa MAPKinasas y ambas se transfieren al núcleo, donde promueven la activación de CREB1 y la inhibición de CREB2. CREB1 activa genes inmediatos que generan los mecanismos necesarios para la síntesis de nuevas proteínas involucradas en el crecimiento de nuevas sinapsis. De forma similar, la aplicación de FMR-Famida activa cascadas bioquímicas que participan en la

activación de CREB2 y genera genes inmediatos que colaboran en la reducción de las conexiones sinápticas. De este modo, las acciones en el núcleo se integran con los procesos sinápticos para producir cambios plásticos a largo plazo (Fig. 15).

Experiencias en ratones

Hasta qué punto lo que antecede tiene carácter más general es la incógnita que ahora se nos plantea. Decíamos al principio que hay dos tipos de memoria. Para saber si los procesos descritos son generales, hemos de estudiar formas más complejas de memoria y organismos más evolucionados. En nues-

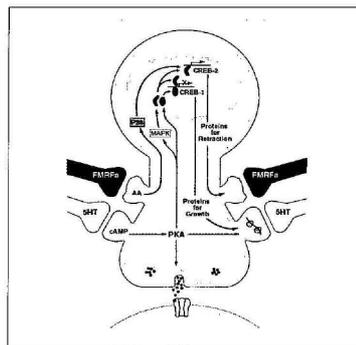


Figura 15.

tro laboratorio trabajamos con ratones. Estos animales pueden ser modificados genéticamente, y poseen un lóbulo temporal desarrollado, con un hipocampo que desempeña funciones similares a las que esta estructura realiza en el humano, es decir, almacenamiento de memorias explícitas.

Nuestro laboratorio se ha enfocado en el estudio del aprendizaje espacial por tres motivos:

- las lesiones del hipocampo interfieren con las tareas espaciales;
- el hipocampo contiene células que representan el espacio e incluyen campos espaciales, y

—el hipocampo tiene un mecanismo celular de aprendizaje, la potenciación a largo plazo (LTP), que se piensa está involucrado en aspectos de la memoria explícita, incluyendo la memoria espacial.

El hipocampo tiene tres vías anatómicas que conectan las áreas que lo componen. El Giro Dentado (GD) recibe vías aferentes de la corteza entorrinal a través de la vía perforante. El GD se conecta con el área CA3 mediante las fibras musgosas. Finalmente, el área CA3 se relaciona con CA1 a través de las fibras colaterales Schaffer (Fig. 16). Todas estas regiones son capaces de inducir LTP.

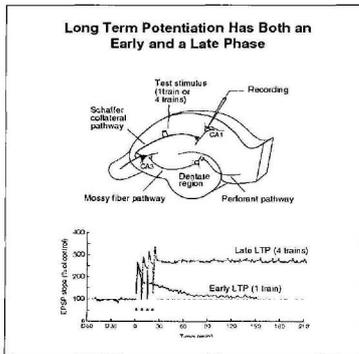


Figura 16.

La LTP consiste en esencia en un aumento en los potenciales excitatorios postsinápticos debido a una fuerte estimulación de las fibras aferentes. Esta potenciación puede durar minutos, horas o semanas. La duración del fenómeno depende principalmente de la intensidad y frecuencia de la estimulación usada para la inducción. La LTP tiene dos fases: una temprana, que requiere modificación covalente de proteínas ya ubicadas en las sinapsis, y una tardía, que exige síntesis de nuevas proteínas. Aunque en las distintas áreas del hipocampo hay algunas diferencias en la forma de inducir el LTP temprano, existen numerosas similitudes en los mecanismos que provocan el LTP tardío.

El neurotransmisor excitatorio glutamato es el mediador en la transmisión sináptica en las sinapsias de las áreas CA3 y CA1. Aunque existen otros transmisores que juegan un importante papel modulador, concentraremos nuestra atención en glutamato (Fig. 17). En circunstancias de transmisión sináptica normal, hay tres tipos fundamentales de receptores glutaminérgicos: NMDA (N-metil-D-aspartato, bloqueado por  $Mg^{2+}$ ), AMPA (a-amino 3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico) y receptor metabotrópico; este último es de acción más lenta, al estar acoplado a proteínas G. El receptor activa la fosfolipasa C (PLC), que a su vez pone en marcha una cascada bioquímica que culmina en la liberación de

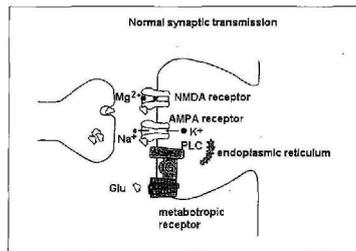


Figura 17.

$Ca^{2+}$  intracelular desde el retículo endoplásmico. De este modo, en condiciones normales el  $Ca^{2+}$  que entra en la célula —en su citosol— sólo proviene de estructuras endocelulares y del que accede a través de los canales voltaje-dependientes activados por los receptores AMPA.

Ahora bien: cuando se produce una fuerte estimulación de las fibras aferentes, se libera una cantidad considerablemente mayor de neurotransmisor en el espacio intersináptico, y eso determina una fuerte despolarización en la célula postsináptica. Esta despolarización desplaza el  $Mg^{2+}$  que bloquea el receptor NMDA y esto conlleva una entrada masiva de  $Ca^{2+}$  en la célula postsináptica. El incremento en  $Ca^{2+}$  activa la calmodulina, la que —a través de varias kina-

sas— procura la fosforilación de los receptores AMPA y de un mensajero retrógrado, que a su vez aumenta la cuantía de neurotransmisor liberado por la célula presináptica (Fig. 18). Si bien, como vemos, esta fase temprana no guarda mucha similitud con el proceso a corto plazo que acontece en Aplysia, la situación es diferente cuando nos referimos al largo plazo. Al aplicar trenes repetidos de estimulación, se genera en efecto un incremento en los niveles de AMP cíclico, mediado por el alza en los niveles de  $Ca^{2+}$  proveniente de los receptores NMDA. El aumento de cAMP es seguido por la activación de PKA y la fosforilación de CREB. Este factor de transcripción activa genes inmediatos que inducen el crecimiento de nuevas sinapsis (Fig. 19). Podríamos preguntarnos: ¿por qué la fosforilación de CREB es necesaria para la

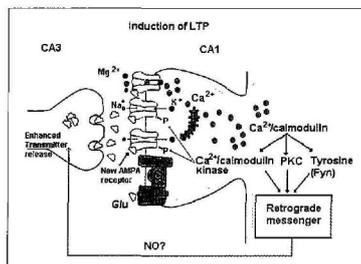


Figura 18.

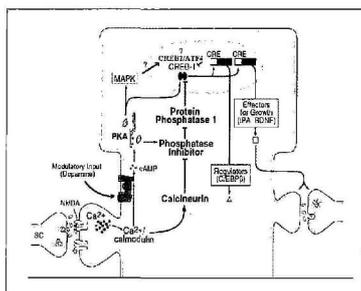


Figura 19.

consolidación del LTP? Para responder a este interrogante, Ángel Barco generó ratones con una forma constitutivamente activa de CREB. En este tipo de ratón, la manipulación genética está bajo el control de un promotor espacial y otro temporal. En concreto, en una línea de ratones se introduce un promotor que restringe la mutación a zonas del cerebro anterior; eso limita la expresión de la mutación a áreas concretas y no a todo el animal, evitando posibles problemas en su desarrollo. Este promotor está ligado a una molécula que es sensible a una tetraciclina (o doxiciclina). Cuando tetraciclina está presente, la molécula en cuestión activa el gen. En una segunda línea, se introduce el gen que produce la forma constitutivamente activa de CREB (WP16-CREB). Cruzando estas dos líneas, obtenemos un ratón que expresa el gen sólo en el cerebro anterior y cuya expresión está controlada temporalmente por la tetraciclina (Fig. 20).

Juan Marcos Aurelio realizó los experimentos de fisiología en estos ratones. Los resultados (Fig. 21) mostraron que cuando LTP se induce con un solo tren de 100 Hz por un segundo, los animales control muestran LTP temprano y la potenciación luego decae; por contra, este protocolo induce LTP tardío en ratones que expresan la forma constitutivamente activa de CREB. Cuando LTP es provocado con 4 trenes de 100 Hz, los animales transgénicos muestran evi-

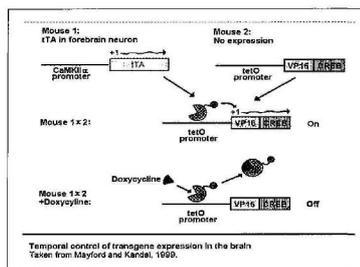


Figura 20.—Transcripción regulada de una forma constitutivamente activa del activador CREB1 (VP16-CREB) en cerebro de ratón.

dencia de «saturación», ya que los niveles de LTP son más bajos que los observados en los controles. Estos fenotipos desaparecen en animales alimentados con doxiciclina.

Para analizar las características de la fase tardía observada en ratones que expresan la forma constitutivamente activa de CREB, se replicó el experimento anterior –inducción de LTP con un tren de 100 Hz– en presencia de inhibidores de transcripción y de traducción (Fig. 22). Los resultados indicaron que la inhibición de la transcripción no afecta a los ratones mutantes, hecho que sugiere que las proteínas nece-

sarias para la fase tardía ya estaban transcritas. Por su parte, el inhibidor de la traducción sólo afecta a estos animales parcialmente. Por lo tanto, puede concluirse que en estos ratones los mensajeros y la mayor parte de las proteínas necesarias para el crecimiento de nuevas sinapsis ya están presentes en las células.

Para plasmar esta tarea de comportamiento, los ratones son entrenados en el «laberinto de agua» de Morris (Fig. 23), donde los animales han de encontrar una plataforma sumergida partiendo de varias posiciones diferentes. Para aprender esta tarea, deben hacer uso de guías espaciales colocadas alre-

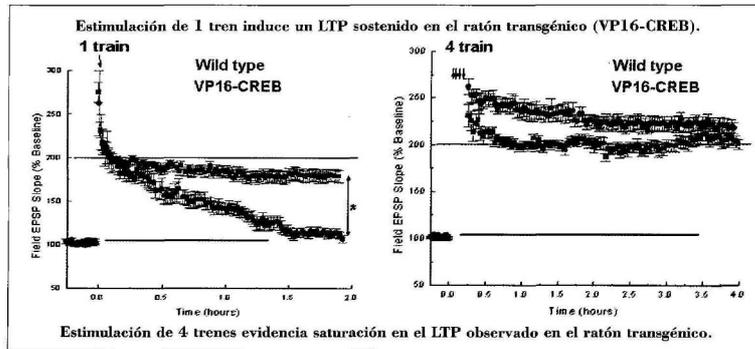


Figura 21.

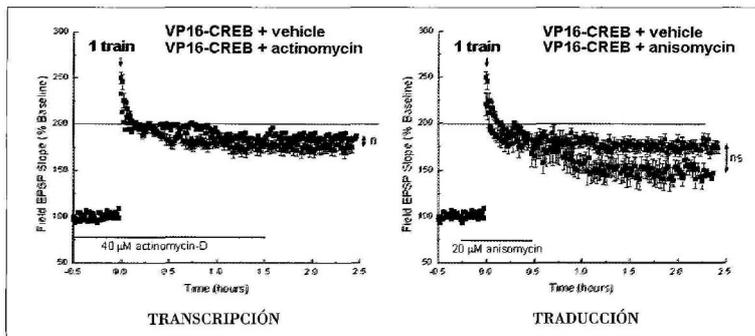


Figura 22.–El LTP en el ratón transgénico es independiente de síntesis de macromoléculas.

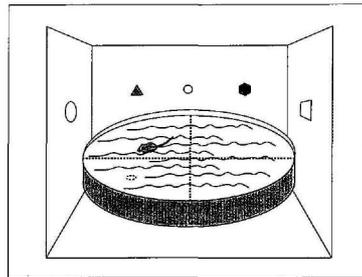


Figura 23.-Laberinto de agua de Morris para el estudio de memorias declarativas.

dedor de la piscina que contiene la plataforma. Tras la etapa de adquisición, los animales son testificados a diferentes intervalos durante pruebas en las que la plataforma se quita del agua. El tiempo que tarde el animal y las veces que cruza el cuadrante correcto se usan como variables dependientes. En este sistema, los ratones que expresan la forma constitutivamente activa de CREB evidencian más dificultad en cuanto a encontrar la plataforma sumergida cuando han pasado dos semanas desde el final del entrenamiento (Fig. 24).

Las conclusiones son por tanto de este tenor: -La mutación que induce una forma constitutivamente activa de CREB produce un

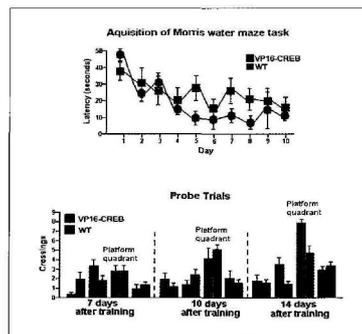


Figura 24.-Comportamiento en ratones que expresan CREB constitutivamente activo.

LTP de larga duración con un protocolo que sólo provoca LTP temprano en animales control.

-Dicho LTP es insensible a fármacos que inhiben la transcripción y la síntesis de proteínas, y

-Se produce una dificultad de memoria en las estimulaciones repetitivas posiblemente por saturación del sistema.

La pregunta siguiente es ésta: ¿cuáles serían las consecuencias de comportamiento y fisiológicas si se disminuye el nivel de represores?

La estrategia utilizada para reducir la concentración de represores incluye:

-uso de un dominante negativo que interfiera con todas las formas de C/EBP, entre las que se encuentra ATF4, que es un equivalente u homólogo de CREB2 en el cerebro de los mamíferos;

-control temporal y anatómico de la transcripción por el uso de un promotor específico para el cerebro anterior y un sistema regulado por tetraciclina.

Todas estas moléculas pertenecientes a la familia de factores de transcripción C/EBP se caracterizan por tener una estructura de cierre formada por leucina, en la cual se inserta el ADN. La modificación de este cierre por mutación impide por tanto la inserción del ADN (Fig. 25). El estudio por Western Blot nos muestra que los niveles de ATF4 son más bajos en los animales transgénicos que en los controles. Esto se debe a que la estructura del dominante negativo es más inestable que la del cierre normal,

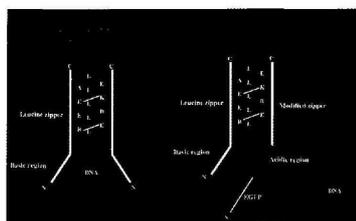


Figura 25.-Diseño del Dominante Negativo para genes C/EBP.

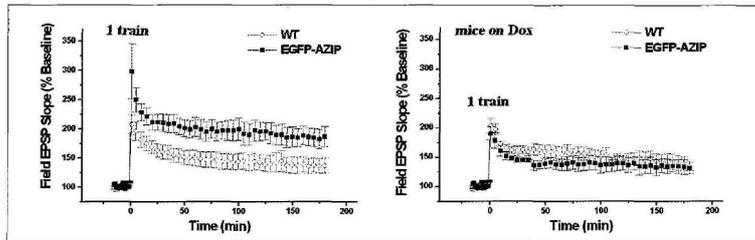


Figura 26.—Los animales transgénicos muestran un LTP más robusto cuando son estimulados con un tren de 100 Hz.

lo cual motiva una degradación de estas moléculas, y por ende una disminución en los niveles de la familia C/EBP y ATF4. Cuando se estudia LTP inducido por un tren de mutantes de C/EBP, en forma similar a lo observado en animales que expresan CREB constitutivamente activo, LTP se ve incrementado en los transgénicos en comparación con los controles (Fig. 26). Este aumento desaparece en los ratones que han sido alimentados con tetraciclina, lo que demuestra que el transgén es el responsable del incremento observado. La fase tardía de LTP es inhibida en estos ratones por los frenadores de la síntesis de proteínas (Fig. 27). Tales resultados indican que manipulando el nivel de represores disminuimos el umbral para la activación de los procesos tardíos, si bien las proteínas necesarias para el crecimiento aún deben ser manufacturados por la célula.

Los animales fueron entrenados en el laberinto de Morris con una sola sesión. Este entrenamiento moderado mostró que los ratones transgénicos aprenden más rápido y recuerdan más que los controles (Fig. 28). Estos resultados se verificaron con otras tareas dependientes del hipocampo, y las memorias desaparecieron en los animales alimentados con doxiciclina. Pueden resumirse los experimentos realizados con ratones mutantes de C/EBP en tres puntos:  
 —la disminución del represor ATF4 resulta en un LTP más robusto en el área CA1 del hipocampo y mejora en el aprendizaje y la memoria;  
 —estos cambios en plasticidad y aprendizaje se producen porque disminuye el umbral necesario para activar factores de transcripción que participan en la consolidación de la memoria, y

113

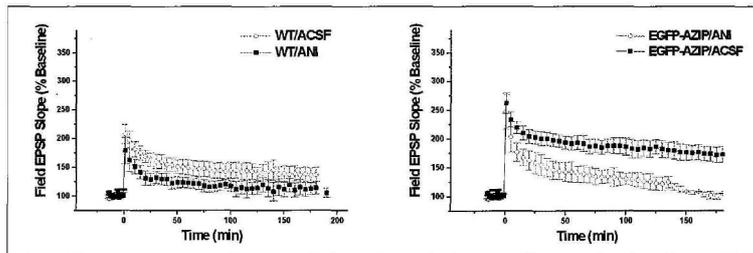


Figura 27.—La fase tardía del LTP inducido en los animales transgénicos es dependiente de síntesis de proteínas.

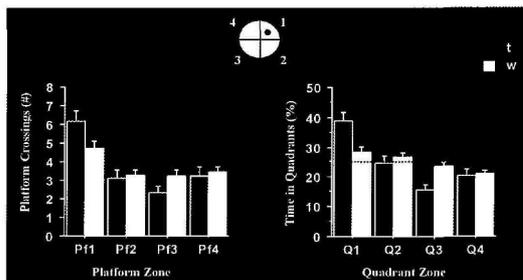


Figura 28.—Los animales transgénicos retienen la memoria espacial por más tiempo que los animales del grupo control.

—las mejoras en aprendizaje y memoria requieren que los mecanismos necesarios para la consolidación estén intactos.

#### Conclusiones generales

De todo lo que antecede, pueden extraerse cuatro conclusiones:

1. Hay una lógica característica en las respuestas a nivel celular y molecular para la

expresión de plasticidad a corto y largo plazo, que se conservan desde *Aplysia* a los mamíferos y es compartida por formas de memoria explícita e implícita.

2. A nivel celular, las formas de memoria explícita e implícita son almacenadas como cambios en la fuerza sináptica, y estos cambios se correlacionan con las fases de comportamiento correspondientes a memoria a corto y largo plazo.

3. A nivel molecular, los cambios a corto plazo implican la modificación covalente de proteínas preexistentes, lo que lleva a la modificación de las conexiones también preexistentes. Los cambios a largo plazo involucran activación de la expresión de genes, síntesis de proteínas y formación de nuevas conexiones anatómicas.

4. Mientras que la memoria a corto plazo utiliza diferentes cascadas para la memoria explícita e implícita, la memoria a largo plazo implica una secuencia bioquímica que se conserva a lo largo de la evolución, y que estriba en la activación de PKA, MAPK y CREB 1 (Fig. 29). ◀

114



Figura 29.

Isabel A. Muzzio