



Universidad de Jaén

Facultad de Ciencias
Experimentales

BASES MOLECULARES DE LA MEMORIA: APLICACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE LA TECNOLOGÍA DE *ENGRAM CELLS.*

Autor: Paola Belén Suárez Pesántez

Grado: Biología

Fecha: 14/05/2025

CREA

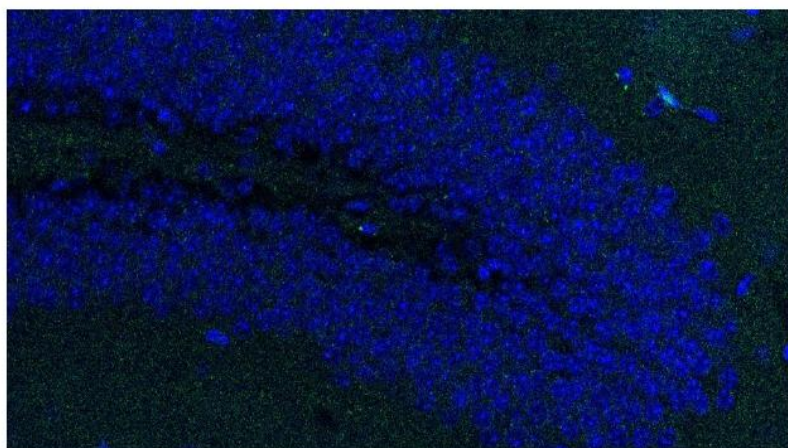


Universidad de Jaén



Trabajo Fin de Grado

BASES MOLECULARES DE LA MEMORIA: APLICACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE LA TECNOLOGÍA DE ENGRAM CELLS.



Alumno/a: Paola Belén Suárez Pesántez

Jaén, Mayo, 2025

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. Tecnología del Engram.....	2
1.1.1. Optogenética.....	2
1.1.2. Optogenética bioluminiscente.....	5
1.1.2. Quimiogenética.....	5
1.2. Funcionamiento molecular de la memoria.....	6
1.2.1. Codificación.....	6
1.2.2. Consolidación.....	6
1.2.3 y 1.2.4. Almacenamiento y Recuperación.....	7
1.3. Anatomía funcional del hipocampo.....	8
2. OBJETIVOS.....	8
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
3.1. Declaración de ética.....	9
3.2. Obtención de las muestras.....	9
3.2.1. Administración de vectores virales, perfusión y fijación.....	9
3.2.2. Corte.....	10
3.3. Diseño experimental.....	10
3.3.1. Experimento 1. Análisis del marcaje de EGFP en engram cells a diferentes concentraciones del anticuerpo anti-GFP.....	10
3.3.2. Experimento 2. Análisis del marcaje de c-Fos en células c-Fos ⁺ , a diferentes concentraciones del anticuerpo anti-c-Fos.....	10
3.4. Tinción inmunohistoquímica.....	11
3.5. Imágenes y recuento celular.....	11
3.6. Análisis estadístico.....	12
4. RESULTADOS.....	12
4.1. Resultados del Experimento 1. Análisis del marcaje de EGFP en engram cells a diferentes concentraciones del anticuerpo anti-GFP.....	12
4.1.1. Intensidad media de la señal de EGFP.....	14
4.1.2. Densidad de engram cells dentro del hipocampo.....	16
4.2. Resultados del Experimento 2. Análisis del marcaje de c-Fos en células c-Fos ⁺ , a diferentes concentraciones del anticuerpo anti-c-Fos.....	18
4.2.1. Análisis semi-cuantitativo del marcaje de c-Fos en células c-Fos ⁺	20
5. DISCUSIÓN.....	21
5.1. Experimento 1. Experimento 1. Análisis del marcaje de EGFP en engram cells a diferentes concentraciones del anticuerpo anti-GFP.....	21
5.1.1. Intensidad media de la señal de EGFP.....	21
5.1.2. Densidad de engram cells dentro del hipocampo.....	22
5.2. Experimento 2. Análisis del marcaje de c-Fos en células c-Fos ⁺ , a diferentes concentraciones del anticuerpo anti-c-Fos.....	22
5.2.1. Análisis semi-cuantitativo del marcaje de c-Fos en células c-Fos ⁺	22
6. CONCLUSIONES.....	23
6.1. Aplicación y optimización de la tecnología del engram en tejido cerebral de ratón.....	23

6.2. Optimización de la técnica de inmunohistoquímica para EGFP.....	23
6.3. Análisis de la intensidad media de señal en las engram cells.....	24
6.4. Análisis de la densidad de engram cells (EGFP+) dentro del área del hipocampo..	24
6.5. Optimizar la técnica de inmunohistoquímica de c-Fos en tejido cerebral de ratón...	24
6.6. Análisis semi-cuantitativo de c-Fos en el tejido cerebral de ratón.....	24
7. BIBLIOGRAFÍA.....	24

RESUMEN.

La memoria se describe como la capacidad de almacenar y utilizar la información obtenida por el organismo para adaptarse y sobrevivir al entorno. Su estudio implica entender cómo se codifica, se consolida, se almacena y se recupera esta información a nivel molecular y celular (Ortega-de San Luis & Ryan, 2022). Una teoría ampliamente aceptada en neurociencia postula que la información se almacena en grupos específicos de neuronas denominadas como “*engram cells*”. Estas neuronas se activan durante el aprendizaje y experimentan cambios fisicoquímicos que permiten la consolidación del recuerdo (Semon, 1925). Las *engram cells* han surgido, por ende, como un concepto clave para explicar cómo los recuerdos se forman a nivel molecular y celular (Choi *et al.*, 2018). Por esto mismo, aplicar y optimizar la tecnología que permite su identificación, es de suma importancia para estudiar las bases moleculares de la memoria (Najenson, 2021).

ABSTRACT.

Memory is defined as the ability to store and utilize information acquired by an organism to adapt to and survive in its environment. Investigating memory requires an understanding of how information is encoded, consolidated, stored, and recalled at molecular and cellular levels (Ortega-de San Luis & Ryan, 2022). One widely accepted theory in neuroscience posits that information is stored in specific sets of neurons known as “*engram cells*”. These neurons are activated during learning and undergo physicochemical changes that support the consolidation of memory (Semon, 1925). As such, *engram cells* have emerged as a central concept in elucidating how memories are formed and maintained at the molecular and cellular levels (Choi *et al.*, 2018). For this reason, applying and optimizing the technology that allows its identification is of utmost importance to study the molecular bases of memory (Najenson, 2021).

Palabras clave: memoria, *engram cells*, optogenética, c-Fos, EGFP

1. INTRODUCCIÓN.

La idea de que los recuerdos se guardan en el cerebro a lo largo del tiempo, se remonta a la época de Platón y Aristóteles (350 a.C.). No obstante, la primera referencia científica sobre el funcionamiento de la memoria en *engram cells* surgió por primera vez a principios del siglo XX, cuando en 1904, Richard Semon, acuñó el término “*engram*”, describiéndolo como el sustrato neuronal donde se almacenan los recuerdos (Josselyn & Tonegawa, 2020). A pesar de que durante su vida sus investigaciones fueron desestimadas, en los últimos años, gracias al avance científico en la ingeniería genética, la optogenética, quimiogenética y otras tecnologías, actualmente es posible llevar a cabo estudios que permiten la identificación de *engram cells* (Tonegawa *et al.*, 2015; Roy *et al.*, 2016).

1.1. Tecnología del Engram.

La tecnología del engram surge con el propósito de identificar, manipular y estudiar las *engram cells* (Tonegawa *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2012). Dicha tecnología incluye los ya mencionados campos científicos como: la ingeniería genética, la optogenética y la quimiogenética. Estas disciplinas, cuentan con una serie de herramientas y técnicas basadas en la utilización de la activación de genes de expresión temprana (IEGs, immediate early genes), para el diseño de vectores genéticos que permitan el marcaje y el manejo de estas neuronas. Este es el caso del gen c-Fos, el cual, se ha demostrado que se activa en las primeras etapas de los procesos de aprendizaje o memoria (Herrera & Robertson, 1996). A partir de este hecho, se pueden realizar diversas estrategias que permitan la identificación de *engram cells* mediante vectores genéticos que hagan uso del promotor del gen c-Fos (Bialy & Kaczmarek, 1996; Lu *et al.*, 2022).

1.1.1. Optogenética.

La optogenética (*optos* ‘luz’, *gen*, ‘origen’) es una técnica que tiene por estrategia utilizar proteínas fotosensibles, es decir, proteínas inducibles por la luz, conocidas como opsinas, en combinación con el promotor del gen c-Fos en constructos genéticos para el estudio de *engram cells* (Sakai *et al.*, 2022). Estas proteínas, una vez se expresan, actúan como bombas o canales iónicos que permiten regular la actividad neuronal con una alta precisión mediante la aplicación controlada de estímulos luminosos (Berglund *et al.*, 2021). La proteína fotosensible más utilizada

en esta técnica es una opsina transmembrana denominada como Canalrodopsina-2 (ChR2), que actúa como un canal de paso de cationes (Ji & Wang, 2016).

Liu y compañía en el año 2012 (Liu *et al.*, 2012), pusieron a prueba esta técnica al emplear un cóctel de vectores virales (AAV9, Adeno-Associated Virus serotype 9): uno para introducir el gen de la tTA (tetracycline transactivator) bajo el promotor de c-Fos; y otro para introducir el gen de la opsina ChR2 junto a un marcador fluorescente EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) bajo el promotor de la tetraciclina (TRE, Tet Response Element). Introdujeron estos vectores virales en neuronas del giro dentado (DG, dentate gyrus), una subregión del hipocampo implicada en la memoria (Knierim, 2015), de ratones genéticamente modificados (c-fos-tTA mice). Asimismo, implantaron una fibra óptica en el cerebro de estos ratones para la transmisión de la luz. En estos animales, la activación del gen c-Fos se produce durante la formación de un recuerdo, lo que permite que tTA induzca la expresión de ChR2 y EGFP bajo el control del promotor TRE. Este sistema está regulado por la administración de doxiciclina (DOX) (Reijmers *et al.*, 2007). De tal forma que, en presencia de DOX, el transactivador tTA queda inhibido impidiendo la expresión de ChR2 Y EGFP bajo el promotor TRE y por ende impidiendo el marcaje de *engram cells*. Mientras que, en ausencia de DOX, tTA puede unirse a TRE y activar la expresión de ChR2 y EGFP, permitiendo el marcaje exclusivamente en las neuronas que se encuentren activas durante el proceso de aprendizaje, creándose así una ventana temporal específica que permite el etiquetado de *engram cells*. Para poner a prueba la eficacia de esta técnica se realizó un protocolo experimental basado en el condicionamiento conductual del animal a un contexto determinado (CFC, contextual fear conditioning). Para ello, se habituó al animal durante 5 días a un contexto A (sin descargas eléctricas), en presencia de DOX (pre-marcaje). Posteriormente se le expuso a un contexto B (con descargas eléctricas), para producir un recuerdo aversivo (miedo), en ausencia de DOX, permitiendo el marcaje selectivo de *engram cells* (marcaje). Finalmente, se cerró la ventana de marcaje de *engram cells* volviendo a administrar DOX (post-marcaje). Se observó que, si se sometía al animal a una longitud de onda de luz azul de 473nm mediante la fibra óptica, en un contexto A, la respuesta de este era quedarse paralizado (freezing), lo que indicaba que estaba evocando el recuerdo de miedo. De esta forma, queda demostrado que la optogenética es capaz de regular selectivamente la activación de los recuerdos (Fig 1.1).

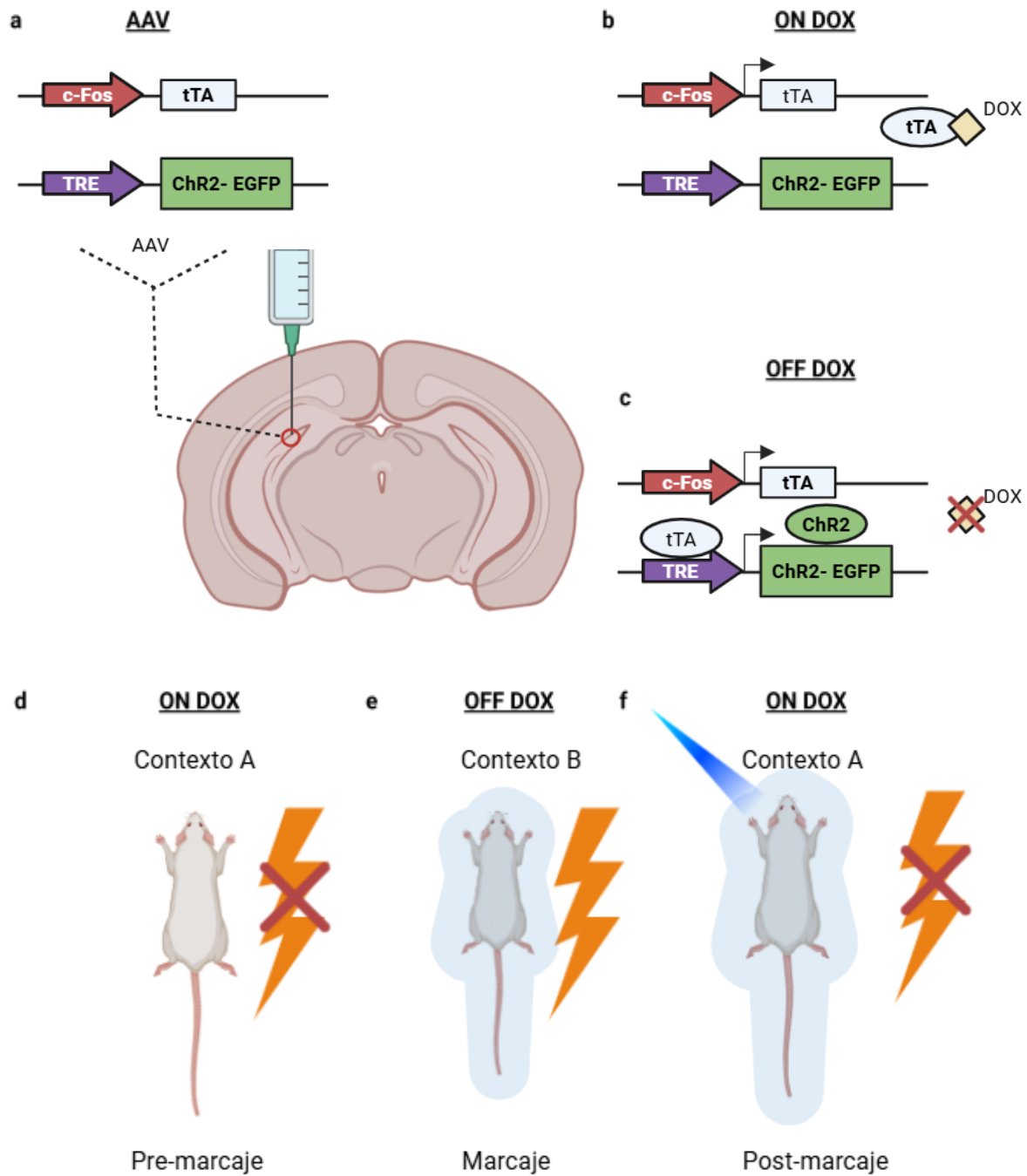


Figura 1.1. Representación gráfica de la optogenética. Se administra el cóctel de vectores en la región del hipocampo (a). En presencia de DOX, se impide que la tTA se una al promotor TRE, por lo que, no se expresan las proteínas ChR2 y EGFP (b). En ausencia de DOX, tTA puede unirse al promotor TRE y permitir la expresión de ChR2 y EGFP (c). En un contexto A, sin descargas eléctricas y en presencia de DOX, no se producirá marcaje de *engram cells* (d). En un contexto B, con descargas eléctricas y en ausencia de DOX, se genera una recuerdo de miedo (freezing) y se produce el marcaje de *engram cells* (e). En un contexto A post-marcaje, sin descargas eléctricas, pero con una fuente de luz que incide en el hipocampo, se produce la respuesta de miedo (f). Imagen generada utilizando BioRender.

1.1.2. Optogenética bioluminiscente.

La optogenética sigue siendo un campo en constante evolución, por esto mismo, se puede hablar actualmente de la optogenética bioluminiscente. Esta técnica, representa un gran avance dentro del campo de la optogenética, al hacer uso de proteínas de fusión llamadas luminopsinas (LMO), que combinan opsinas sensibles a la luz con luciferasas emisoras de luz. A diferencia de la optogenética convencional, este método permite generar luz internamente mediante una reacción enzimática, lo que elimina la necesidad de fuentes externas de iluminación, como láseres o LEDs y la implantación de fibras ópticas como transmisores de luz (Inagaki *et al.*, 2017). Las LMO se activan a través de la luciferina, un sustrato de la enzima luciferasa que atraviesa la barrera hematoencefálica y produce bioluminiscencia. Hasta la fecha, se han desarrollado diversas LMO aunque en la mayoría de los casos, se utilizan luciferasas marinas, como la luciferasa de *Gaussia* (GLuc) o la luciferasa de *Renilla* (RLuc), las cuales catalizan la coelenterazina (CTZ), su sustrato natural. La funcionalidad de estas proteínas de fusión varía según la opsina acoplada, lo que permite generar respuestas excitatorias o inhibitorias, dependiendo de sus propiedades electrofisiológicas (Berglund *et al.*, 2021).

Si bien la optogenética y su variante bioluminiscente han demostrado ser herramientas poderosas para la manipulación de actividades neuronales, existen otras estrategias que permiten un control menos invasivo, como es el caso de la quimiogenética.

1.1.2. Quimiogenética.

La quimiogenética es una técnica que utiliza receptores diseñados (DREADDs, Designer Receptors Activated Only by Designer Drugs) para responder a fármacos específicos, permitiendo una modulación más prolongada y menos invasiva de la actividad neuronal (Li *et al.*, 2025). Para ello, se utilizan vectores virales que administran estos receptores quimiogenéticos provenientes de receptores naturales que han sufrido mutagénesis dirigida, y se introducen en regiones cerebrales específicas. Cuando se produce el proceso de aprendizaje, se activa el promotor del gen *c-Fos* y en consecuencia, se expresan los receptores quimiogenéticos. Posteriormente, la administración de un fármaco de diseño, como la clozapina-N-óxido (CNO), permite modular la actividad de estas neuronas,

facilitando la activación o inhibición prolongada de los circuitos de memoria sin necesidad de estimulación externa continua (Rawat *et al.*, 2022).

1.2. Funcionamiento molecular de la memoria.

La memoria, como se ha descrito anteriormente, es un proceso biológico complejo que tiene por finalidad adquirir y utilizar la información del entorno para sobrevivir a este. Para comprender mejor sus mecanismos moleculares, es necesario explicar con profundidad sus distintas fases (codificación, consolidación, almacenamiento y recuperación), así como conceptos fundamentales como la plasticidad neuronal y la distinción entre memoria a corto y largo plazo (Ortega-de San Luis & Ryan, 2022).

1.2.1. Codificación.

La codificación constituye la etapa inicial, es decir, el proceso de aprendizaje, donde la información sensorial es captada mediante receptores como: N-metilo-D-aspartato (NMDA) y α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA). Asimismo, durante este proceso de codificación, actúan proteínas de señalización celulares tales como: la calcio/calmodulina proteína quinasa II (CaMKII), proteína quinasa C (PKC), proteína quinasa A (PKA). La señalización molecular llevada a cabo por todos estos factores moleculares, es la que se traduce en patrones de actividad neuronal (Wang *et al.*, 2006). Este proceso implica la primera activación de circuitos neuronales específicos que permiten la entrada de la información adquirida (*input*) (Knoblauch & Sommer, 2016).

La persistencia de estos patrones, y por ende la formación de un recuerdo duradero, depende fundamentalmente de la siguiente fase: la consolidación.

1.2.2. Consolidación

La consolidación es el proceso por el cual la información recién adquirida se vuelve estable (McGaugh, 2000). Este fenómeno se sustenta en la plasticidad sináptica, y esta plasticidad sináptica depende a su vez de cascadas de señalización molecular (Asok *et al.*, 2019). En este contexto, la activación reiterada de estas cascadas de señalización permiten la estabilización de la memoria. Como consecuencia, se produce un fortalecimiento de la transmisión sináptica entre redes neuronales,

proceso que se conoce como potenciación a largo plazo (LTP, long term potentiation) (Bear *et al.*, 2016).

Los eventos moleculares que ocurren en la LTP empiezan cuando una neurona presináptica envía una señal fuerte y reiterada a la neurona postsináptica, provocando la activación de los receptores NMDA y AMPA (Moreau & Kullmann, 2013; Zhou & Sheng, 2013). Esta activación permite la entrada de iones de calcio (Ca^{2+}) al interior de la neurona. El aumento de la concentración de Ca^{2+} activa a las proteínas CaMKII, PKC y PKA. Estas quinasas fosforilan diversas proteínas sinápticas, lo que contribuye al fortalecimiento de la sinapsis, por ejemplo, mediante la inserción de más receptores AMPA en la membrana postsináptica (Pláteník *et al.*, 2000; Morris, 2013). La activación de estas vías de señalización también induce la expresión de genes de respuesta temprana como c-Fos, Arc y Egr-1 (Dudai *et al.*, 2015). A nivel nuclear, se producen cambios epigenéticos como la acetilación de histonas y la metilación del ADN, que regulan la expresión génica necesaria para la consolidación y la estabilidad a largo plazo de la memoria (Day & Sweatt, 2011).

El proceso contrario ocurre en la depresión a largo plazo (LTD, long term depression). La LTD representa un mecanismo para debilitar las sinapsis cuando la actividad neuronal o la estimulación es de baja frecuencia. Este debilitamiento se considera fundamental para el olvido de información irrelevante y la optimización de las redes neuronales. Una estimulación sináptica débil provoca una activación insuficiente de los receptores NMDA, lo que reduce la entrada de iones Ca^{2+} en la neurona postsináptica y limita los procesos de consolidación sináptica necesarios para la estabilización del recuerdo (Bear *et al.*, 2016).

1.2.3 y 1.2.4. Almacenamiento y Recuperación.

Una vez que la información se ha codificado y consolidado, se almacena en grupos específicos de neuronas, es decir, en las *engram cells*, las cuales, cuando se reactivan, permiten la recuperación del recuerdo (*output*). Se sabe que estos dos procesos son llevados a cabo por estas células gracias al avance de la tecnología engram que permiten su identificación (Ryan *et al.*, 2015).

En definitiva, la formación y el mantenimiento de la memoria a nivel molecular, involucra una secuencia coordinada de eventos que van desde la transducción sensorial (codificación) hasta la modificación duradera de las conexiones sinápticas

(consolidación) y la activación de redes neuronales específicas (almacenamiento y recuperación) (Ortega-de San Luis & Ryan, 2022).

1.3. Anatomía funcional del hipocampo.

La comprensión de los mecanismos moleculares implicados en la formación de la memoria requiere tener en cuenta la localización anatómica donde estos procesos tienen lugar: el hipocampo. El hipocampo forma parte del lóbulo límbico, ubicado en la zona medial del lóbulo temporal, e interviene en el procesamiento de la memoria, el aprendizaje, la navegación espacial y las emociones, como se ha evidenciado en diversos estudios (Hannula *et al.*, 2006; Warren *et al.*, 2012; Wible, 2013).

El hipocampo comprende una serie de subregiones que incluyen: el giro dentado (DG), el cornu ammonis (CA) y el subículo (S) (Knierim, 2015). Las regiones CA1 y CA3 del hipocampo desempeñan funciones complementarias en el procesamiento de la memoria. Por un lado, CA1 está implicada en la recuperación de recuerdos generales y en la navegación espacial (Atucha *et al.*, 2023; Dong *et al.*, 2021; Place *et al.*, 2012). Por otro lado, CA3 contribuye a la precisión de los recuerdos y a la codificación del orden temporal de eventos (Atucha *et al.*, 2023; Meyer & Radulovic, 2021). Se puede decir resumidamente que, CA1 sostiene la memoria a largo plazo y CA3 es clave para el recuerdo inmediato.

El DG está formado por tres capas principales: capa molecular (contiene dendritas de la capa granular), capa granular (contiene células granulares), y capa polimórfica (también conocida como hilus, que contiene diversidad neuronal). El giro dentado tiene una estructura curva en forma de plátano que se extiende desde los núcleos septales (rostral) hasta la corteza temporal (caudal) (Amaral *et al.*, 2007). Estudios previos han demostrado que el DG es una subregión del hipocampo esencial para mantener la potenciación a largo plazo (LTP) entre DG y CA3, ya que las células que se mantienen activas por un periodo largo de tiempo para lograr la LTP son las células granulares, las cuales se encuentran exclusivamente en el giro dentado y no en las otras regiones del hipocampo (Messaoudi *et al.*, 2007).

2. OBJETIVOS.

Aunque la tecnología del engram ha sido ampliamente utilizada, su eficiencia y especificidad aún pueden mejorarse mediante ajustes en las condiciones

experimentales. En este trabajo se plantea, aplicar y optimizar la aplicación de dicha tecnología en un contexto experimental determinado.

El **objetivo principal** de este trabajo es:

1. Aplicar y optimizar la tecnología del engram para el estudio de las *engram cells* en tejido cerebral de ratón.

Además de este objetivo principal, se pretende conseguir lo siguiente:

2. Optimizar la técnica de inmunohistoquímica de EGFP en tejido cerebral de ratón.
3. Análisis del nivel de intensidad media de señal de las *engram cells*, identificadas por la expresión de la proteína EGFP.
4. Análisis de la densidad de *engram cells* (EGFP⁺) dentro del área del hipocampo.
5. Optimizar la técnica de inmunohistoquímica de c-Fos en tejido cerebral de ratón.
6. Análisis semi-cuantitativo de c-Fos en el tejido cerebral de ratón.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

Cabe destacar que la declaración ética, así como la administración de los vectores virales, y los procedimientos de perfusión y fijación del tejido cerebral, fueron procesos realizados por profesionales técnicos externos.

3.1. Declaración de ética.

Los procesos experimentales para este proyecto fueron aprobados por el *Animal Ethics Committee de Trinity College* (Dublin), la *Health Products Regulatory Authority* (Irlanda), y se llevaron a cabo en conformidad con la Directiva Europea 2010/63/EU relativa a la protección de los animales utilizados con fines científicos.

3.2. Obtención de las muestras.

3.2.1. Administración de vectores virales, perfusión y fijación

Las muestras cerebrales fueron obtenidas de ratones *wild-type* de la cepa C57BL/6J. Estos ratones fueron inyectados con adenovirus (AAV) que portaban el sistema c-Fos-tTa/TRE-ChR2-EGFP, regulado por la administración de DOX. En este caso, se llevó a cabo un protocolo experimental basado en el condicionamiento conductual del animal al miedo (CFC) realizado en ausencia de DOX, lo que

permitió el marcaje de las *engram cells* asociados a un recuerdo adverso. Dichos ratones fueron sacrificados mediante la administración de una sobredosis de 50 μ L de Na-Pentobarbital por vía intraperitoneal. Una vez confirmada la ausencia de reflejos vitales, se procedió a realizar una perfusión transcardiaca utilizando 50 mL de PBS, con el objetivo de eliminar la sangre circulante y facilitar la posterior fijación del tejido. Seguidamente, se perfundieron con 50 mL de paraformaldehído al 4% (PFA 4%) lo que permitió la fijación de las estructuras cerebrales.

3.2.2. Corte.

Se realizaron cortes coronales del cerebro de 50 μ m de grosor mediante vibratomo (Leica). En todos los casos experimentales, se seleccionaron cortes cerebrales correspondientes a las coordenadas interaural 2.68 mm y bregma -0.94 mm, según la Figura 39 del atlas Paxinos & Franklin (Franklin *et al.*, 2008).

3.3. Diseño experimental.

3.3.1. Experimento 1. Análisis del marcaje de EGFP en *engram cells* a diferentes concentraciones del anticuerpo anti-GFP.

Se seleccionaron un total de 8 cortes histológicos: 4 pertenecientes al animal 1 y 4 al animal 2. Los cortes se distribuyeron de modo que en cada pocillo de la placa se incluyera uno de cada cerebro, dando un total de cuatro pocillos experimentales. Tres de ellos, se utilizaron para probar el anticuerpo anti-GFP a diferentes concentraciones (1:1000, 1:5000 y 1:10000), y el pocillo restante se utilizó como control negativo (sin anticuerpo anti-GFP). De esta forma, se busca evaluar la especificidad y sensibilidad del anticuerpo anti-GFP, con el fin de optimizar su uso en futuras tinciones inmunohistoquímicas.

3.3.2. Experimento 2. Análisis del marcaje de *c-Fos* en células *c-Fos*⁺, a diferentes concentraciones del anticuerpo anti-*c-Fos*.

Se seleccionaron un total de 8 cortes histológicos: 4 pertenecientes al animal 3 y 4 al animal 4. Los cortes se distribuyeron de modo que en cada pocillo de la placa se incluyera uno de cada cerebro, dando un total de cuatro pocillos experimentales. Tres de ellos, se utilizaron para probar el anticuerpo anti-*c-Fos* a diferentes concentraciones (1:1000, 1:5000 y 1:10000), y el pocillo restante se utilizó como

control negativo (sin anticuerpo anti-c-Fos). De este modo, se pretende estudiar la especificidad y sensibilidad del anticuerpo anti-c-Fos con el propósito de optimizar su uso en futuras tinciones inmunohistoquímicas.

3.4. Tinción inmunohistoquímica.

El protocolo de la tinción inmunohistoquímica fue el mismo para ambos experimentos, con la diferencia de aplicar el correspondiente anticuerpo primario según el objetivo de cada uno. Los cortes fueron sometidos a tres lavados de 10 minutos en tampón PBS (phosphate buffer saline) con 0.5% de Tritón X-100 (PBT-0.5%), con el fin de permeabilizar la membrana celular y facilitar la penetración de los anticuerpos. Para minimizar la unión inespecífica de los anticuerpos, las secciones fueron incubadas en una solución de bloqueo compuesta por PBT-0.2% y 10% de suero de cabra (NGS, Sigma) durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, los cortes fueron incubados toda la noche a temperatura ambiente con agitación constante con el anticuerpo primario correspondiente (1:1000, 1:5000, 1:10000), disuelto en la solución de bloqueo (PBT-0.2% y 10% NGS). Para el análisis de EGFP se utilizó el anticuerpo anti-GFP (chicken IgY fraction, A10262, Invitrogen), mientras que para la detección de c-Fos se empleó el anticuerpo anti-c-Fos (rabbit, Ref. 226 008, Synaptic Systems). Después de la incubación del anticuerpo primario a diferentes concentraciones, se realizaron tres lavados de 10 minutos en PBT-0.5% para eliminar el exceso de anticuerpo no unido. Posteriormente, las secciones fueron incubadas con el anticuerpo secundario a 1:1000 (Antirabbit Alexa 568, A11011, Invitrogen) en PBT-0.2% durante 2 horas a temperatura ambiente, en oscuridad y en agitación constante. Tras ello, se realizaron 2 lavados de 10 minutos con la solución PBT-0.2%, seguido de 1 lavado de 5 minutos en DAPI y un lavado último de 5 minutos en PBS. Finalmente, se procedió a montar los cortes sobre portaobjetos superfrost con Fluoromount (Invitrogen).

3.5. Imágenes y recuento celular.

Las imágenes para la detección del EGFP procedente de *engram cells* (Experimento 1) se llevaron a cabo mediante microscopio confocal (TCS SP5II, Leica). Se empleó un objetivo de inmersión en aceite de 40× (OIL), con una resolución de 1024×1024 píxeles, un tamaño de pinhole de 1.3 unidades airey, y line average de 2. Se definió manualmente la región de interés (ROI), en concreto, el giro dentado del hipocampo,

mediante el software FIJI para la determinación del área (μm^2). Las células teñidas con GFP (green) y DAPI (blue) se contaron manualmente tras ajustar los umbrales de detección en un rango de 100-255. Las imágenes para la detección del c-Fos procedente de c-Fos⁺ (Experimento 2) se capturaron mediante microscopio invertido de epifluorescencia (DM IRB, Leica). Se empleó un objetivo HC PL APO 10x/0.4 CS. En este caso, sólo se obtuvieron imágenes para la visualización y el estudio cualitativo de la ausencia o presencia de la señal de c-Fos. Para la representación esquemática se utilizó BioRender.

3.6. Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico de la caracterización de las *engram cells*, se utilizó Microsoft Excel. La significancia estadística se evaluó mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis ante la falta de tamaño muestral y por ende, la imposibilidad de definir una distribución Normal para realizar test paramétricos. El nivel de significancia se estableció en $p = 0.05$. Se utilizó la mediana (Me) y el rango intercuartílico (RIC). Los datos se representan en gráficas de cajas y bigotes (Fig 4.3. y Fig 4.5). Para el estudio de la detección de la señal de c-Fos, se utilizó Microsoft Excel. Sin embargo, ante la escasez de datos, no se pudo establecer un estudio profundo analítico. Por lo que, solamente se representó en forma de histograma los datos para hacer un estudio semicuantitativo.

4. RESULTADOS.

Se obtuvieron los siguientes resultados de la tinción inmunohistoquímica de EGFP y c-Fos a diferentes concentraciones (1:1000, 1:5000, 1:10000).

4.1. Resultados del Experimento 1. Análisis del marcaje de EGFP en engram cells a diferentes concentraciones del anticuerpo anti-GFP.

Para aplicar y optimizar el protocolo de detección de *engram cells* por inmunohistoquímica con anti-GFP, se compararon tres concentraciones diferentes de anticuerpo (1:1000, 1:5000, 1:10000) y se analizó: el nivel de intensidad media de la señal procedente de las *engram cells* (EGFP⁺) (Véase 4.1.1) y el número de *engram cells* (EGFP⁺) a lo largo del DG (DAPI⁺) (Véase 4.1.2.).

Para ello, se obtuvieron imágenes de microscopía confocal de la tinción inmunohistoquímica de GFP (green) en el hipocampo (Fig 4.1.), a diferentes concentraciones (1:1000, 1:5000, 1:10000):

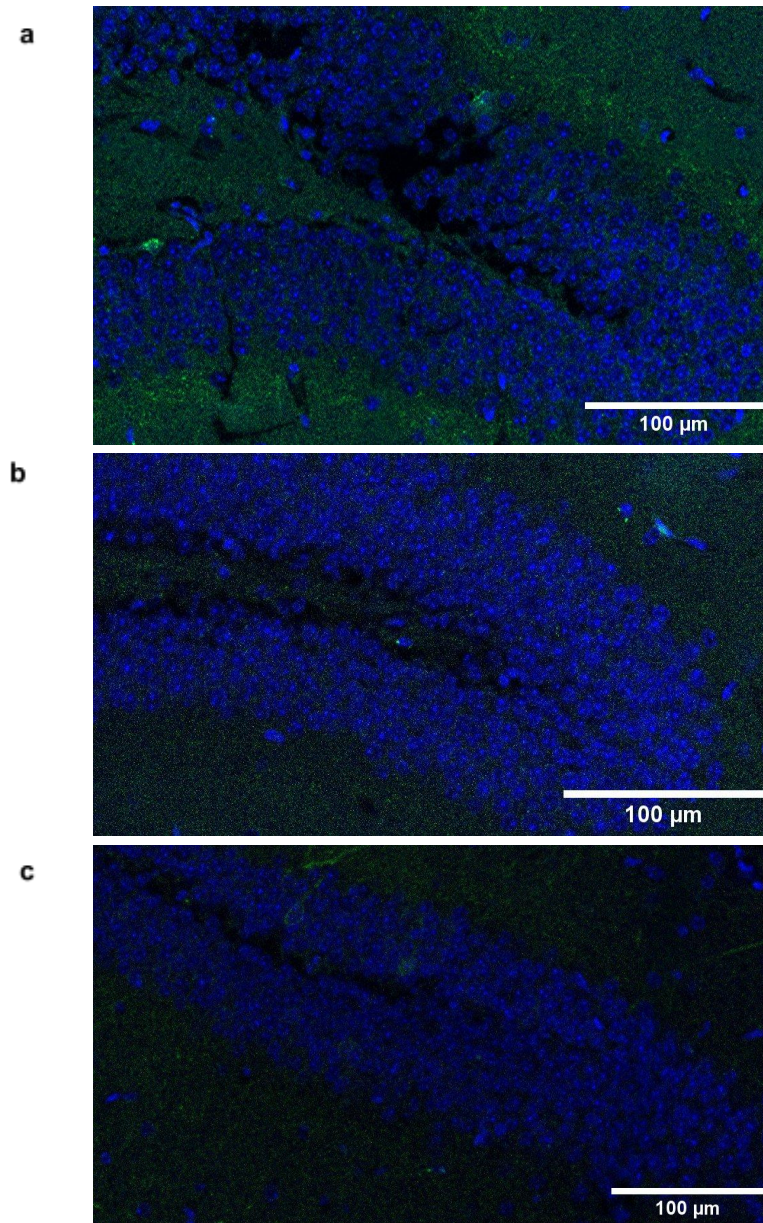


Figura 4.1. Tinción inmunohistoquímica con anti-GFP a diferentes concentraciones: 1:1000 (a), 1:5000 (b), y 1:10000 (c). Se observa la señal de EGFP (green), marcando *engram cells*, y DAPI (blue) para la tinción nuclear del DG. Las imágenes muestran el solapamiento de ambas señales (overlap).

4.1.1. Intensidad media de la señal de EGFP.

Se cuantificó el número de *engram cells* (EGFP⁺) (Fig.4.2.) para evaluar el nivel de intensidad media en cada una de las diferentes concentraciones (1:1000, 1:5000, 1:10000). No se encontraron diferencias significativas tras el estudio estadístico (Tabla 4.1. y Figura 4.3.).

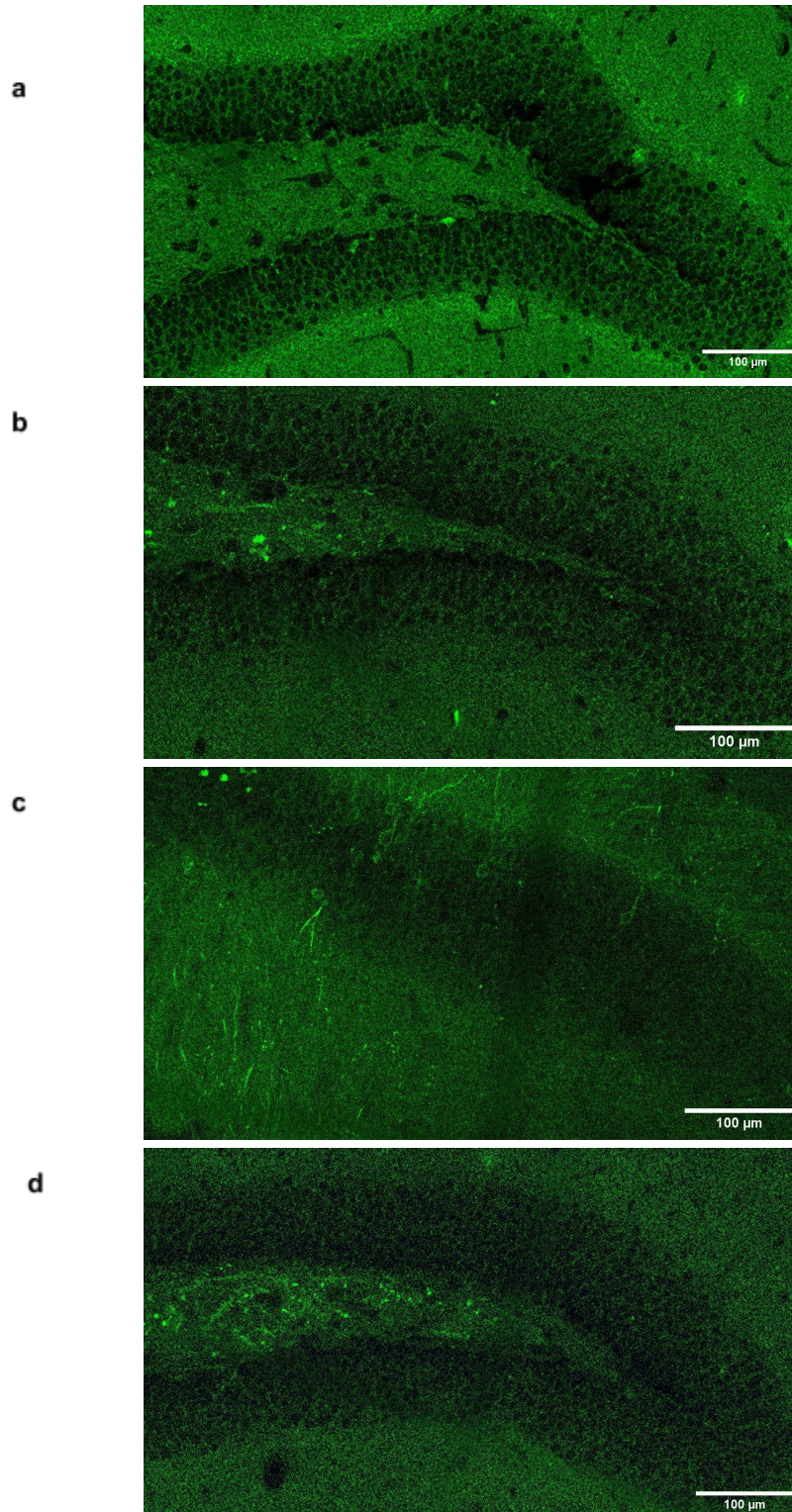


Figura 4.2. Tinción inmunohistoquímica con anticuerpo anti-GFP. Se observa la señal de EGFP (verde), marcando *engram cells*, a diferentes concentraciones: 1:1000 (a), 1:5000 (b) y 1:10000 (c); y el control negativo, sin anticuerpo anti-GFP (d).

Tabla 4.1. Se muestra un resumen de la intensidad media de la señal obtenida para cada concentración del anticuerpo anti-GFP (1:1000, 1:5000 y 1:10000). Para cada concentración, se tuvieron en cuenta dos valores de intensidad media, uno del animal 1 y otro del animal 2, a partir de los cuales se calcularon la mediana (Me) y el rango intercuartílico (RIC). Estos valores resumidos en esta tabla fueron los que se utilizaron para la representación gráfica de la Figura 4.3.

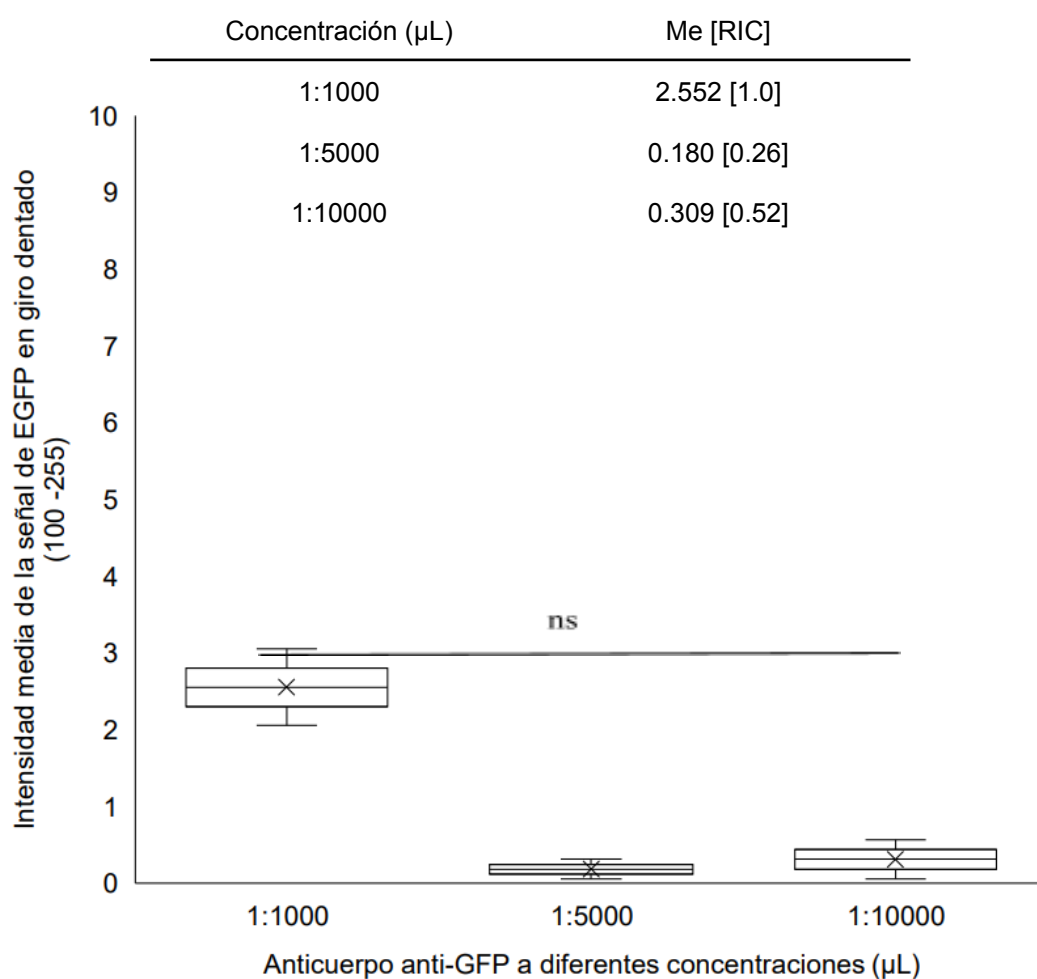


Figura 4.3. Representación gráfica de caja y bigotes para cada una de las concentraciones experimentales (1:1000, 1:5000, 1:10000), que indica la intensidad media de señal de EGFP (rango 100–255) obtenidas del DG. Para cada concentración se obtuvieron dos valores (n=2, por concentración) de intensidad media: uno correspondiente al animal 1 y otro al animal 2. A partir de estos valores se calculó la mediana y el rango intercuartílico (RIC) que se representan en la gráfica. El análisis estadístico se realizó mediante el test de Kruskal-Wallis, cuyo p-valor fue mayor que el

nivel de significancia ($p > 0,05$), lo que indica que no existen diferencias significativas entre las concentraciones analizadas.

4.1.2. Densidad de *engram cells* dentro del hipocampo

Se realizó la detección de núcleos del DG mediante DAPI (Fig 4.4) para obtener el la densidad de *engram cell*, es decir, el N° total de *engram cells*/DAPI⁺, para cada una de las diferentes concentraciones (1:1000, 1:5000, 1:10000). No se encontraron diferencias significativas tras el estudio estadístico (Tabla 4.2. y Figura 4.5.).

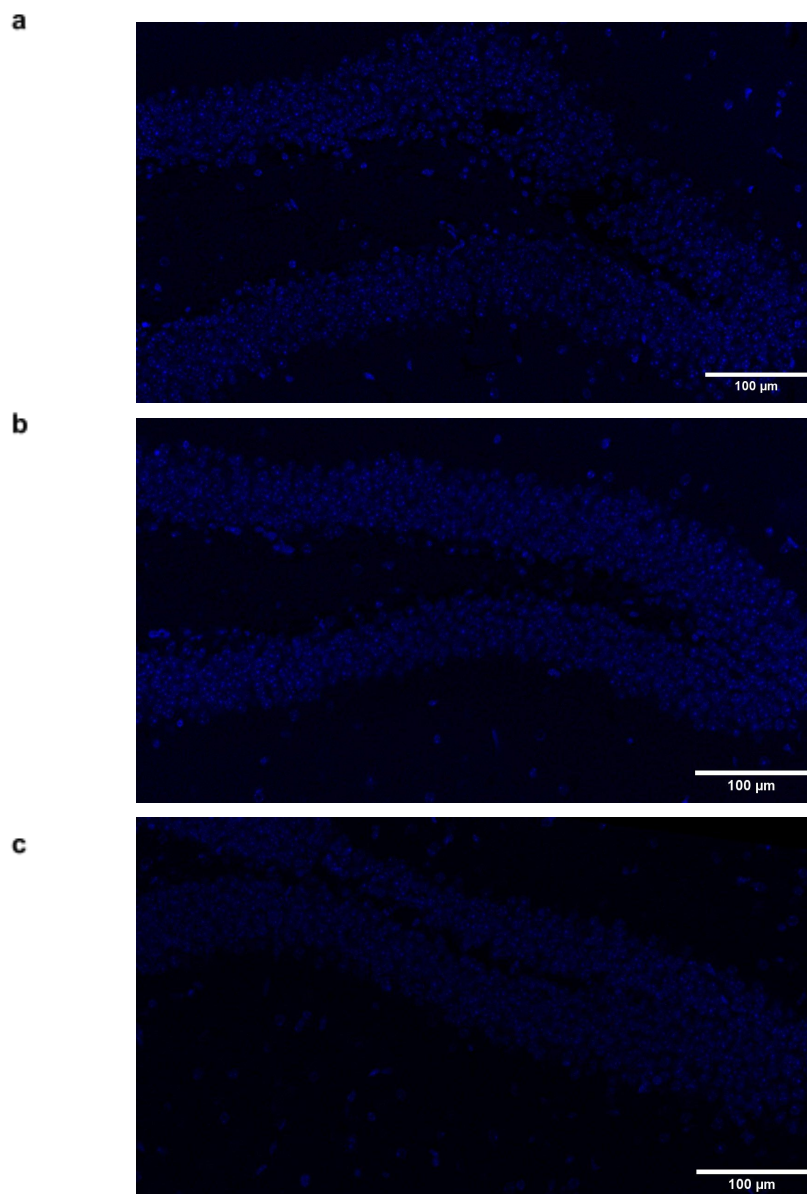


Figura 4.4. Detección de núcleos de las células granulosas del DG mediante DAPI (azul) observada mediante microscopía confocal a 40X a diferentes concentraciones: 1:1000 (a), 1:5000 (b) y 1:10000 (c).

Tabla 4.2. Se muestra un resumen de la densidad de las *engram cells* (Nº de *engram cells*/ DAPI⁺) obtenida para cada concentración del anticuerpo anti-GFP (1:1000, 1:5000 y 1:10000). Para cada concentración, se tuvieron en cuenta dos valores de densidad, uno del animal 1 y otro del animal 2, a partir de los cuales se calcularon la mediana (Me) y el rango intercuartílico (RIC). Estos valores resumidos en esta tabla fueron los que se utilizaron para la representación gráfica en la Figura 4.5.

Concentración (µL)	Me [RIC]
1:1000	0.0032 [0.0009]
1:5000	0.0032 [0.0001]
1:10000	0.0043 [0.0014]

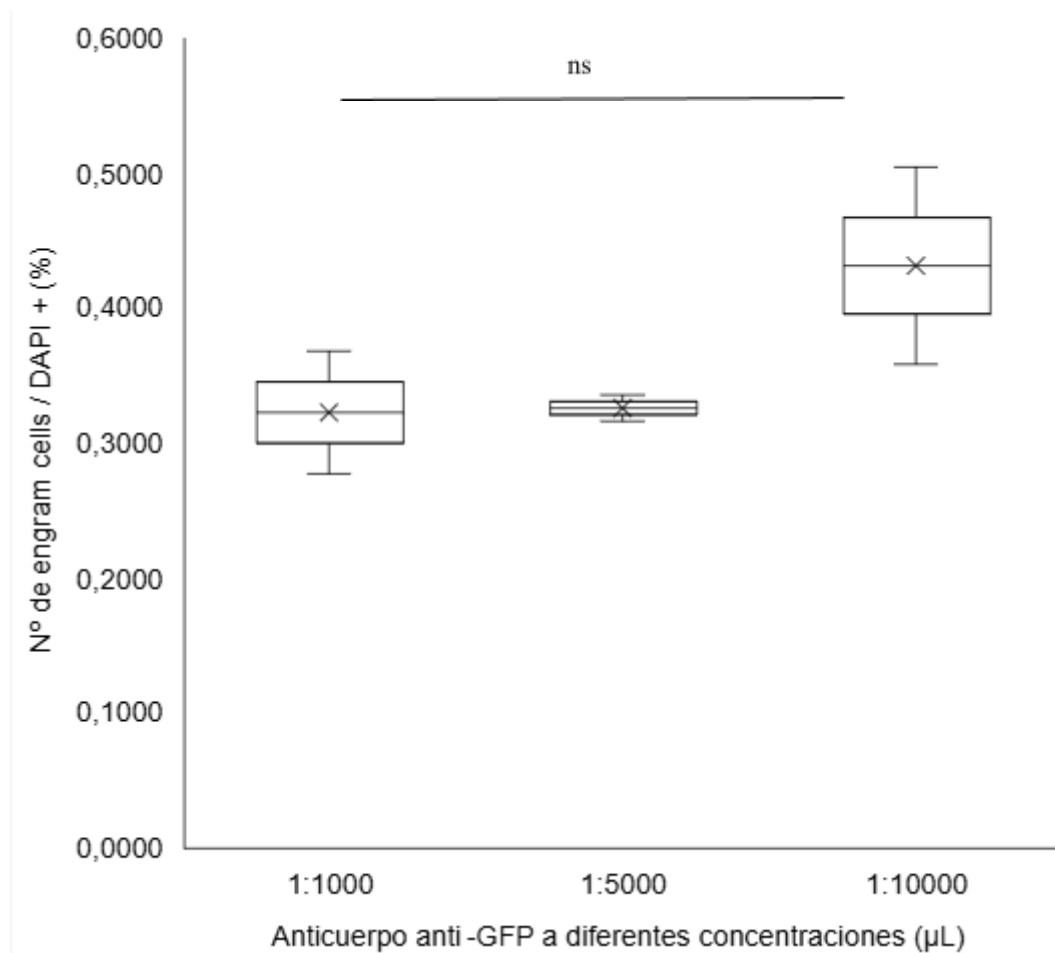


Figura 4.5. Representación gráfica de caja y bigotes para cada una de las concentraciones experimentales (1:1000, 1:5000, 1:10000), que indica la densidad de las *engram cells* (Nº de *engram cells*/DAPI⁺) del giro dentado. Para cada concentración se obtuvieron dos valores (n=2, por

concentración) de densidad: uno correspondiente al animal 1 y otro al animal 2. A partir de estos valores se calculó la mediana y el rango intercuartílico (RIC) que se representan en la gráfica. El análisis estadístico se realizó mediante el test de Kruskal-Wallis, cuyo p-valor fue mayor que el nivel de significancia ($p > 0,05$), lo que indica que no existen diferencias significativas entre las concentraciones analizadas.

4.2. Resultados del Experimento 2. Análisis del marcaje de c-Fos en células c-Fos+, a diferentes concentraciones del anticuerpo anti-c-Fos.

Para aplicar y optimizar el protocolo de detección de *engram cells* por inmunohistoquímica con anti-c-Fos, se compararon tres concentraciones de anticuerpo (1:1000, 1:5000, 1:10000) y se analizó la sensibilidad y especificidad del anticuerpo c-Fos (Fig. 4.6) y se evaluó su nivel de intensidad media (Tabla 4.3. y Fig 4.7.). Para ello, se obtuvieron imágenes de microscopía invertida de epifluorescencia de la tinción inmunohistoquímica de c-Fos (red) (Fig 4.6.), a diferentes concentraciones (1:1000, 1:5000, 1:10000).

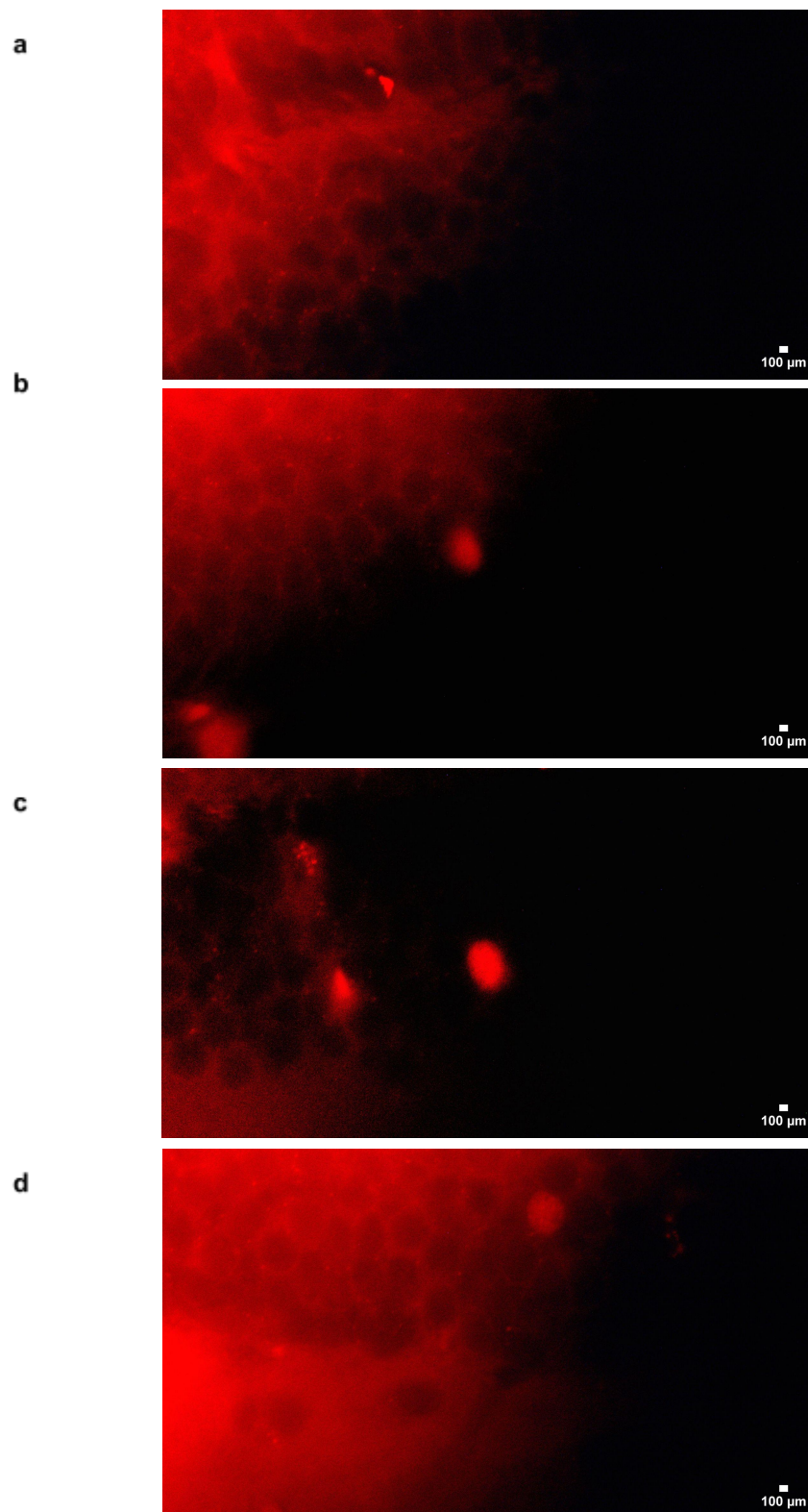


Figura 4.6. Tinción inmunohistoquímica con anticuerpo anti-c-Fos (red), observada mediante microscopía invertida de epifluorescencia a 10x a diferentes concentraciones: 1:1000 (a), 1:5000 (b) y 1:10000 (c).

4.2.1. Análisis semi-cuantitativo del marcaje de c-Fos en células c-Fos+.

Se analizó la eficiencia del anticuerpo anti c-Fos identificando la presencia o ausencia de al menos una *engram cell* por cada concentración aplicada (Fig 4.6.). Asimismo, se obtuvo el nivel de intensidad de señal media de cada *engram cell*, con la precaución de normalizar los datos obtenidos de la intensidad de la señal por el área correspondiente de dicha célula (Tabla 4.3 y Fig.4.7).

Tabla 4.3. Se muestra un resumen de la intensidad media de la señal (100–255) obtenida para cada concentración del anticuerpo anti-c-Fos (1:1000, 1:5000 y 1:10000). Para cada concentración se analizó una única célula c-Fos+, y la intensidad se normalizó dividiendo la intensidad media de la señal por el área correspondiente de dicha célula.

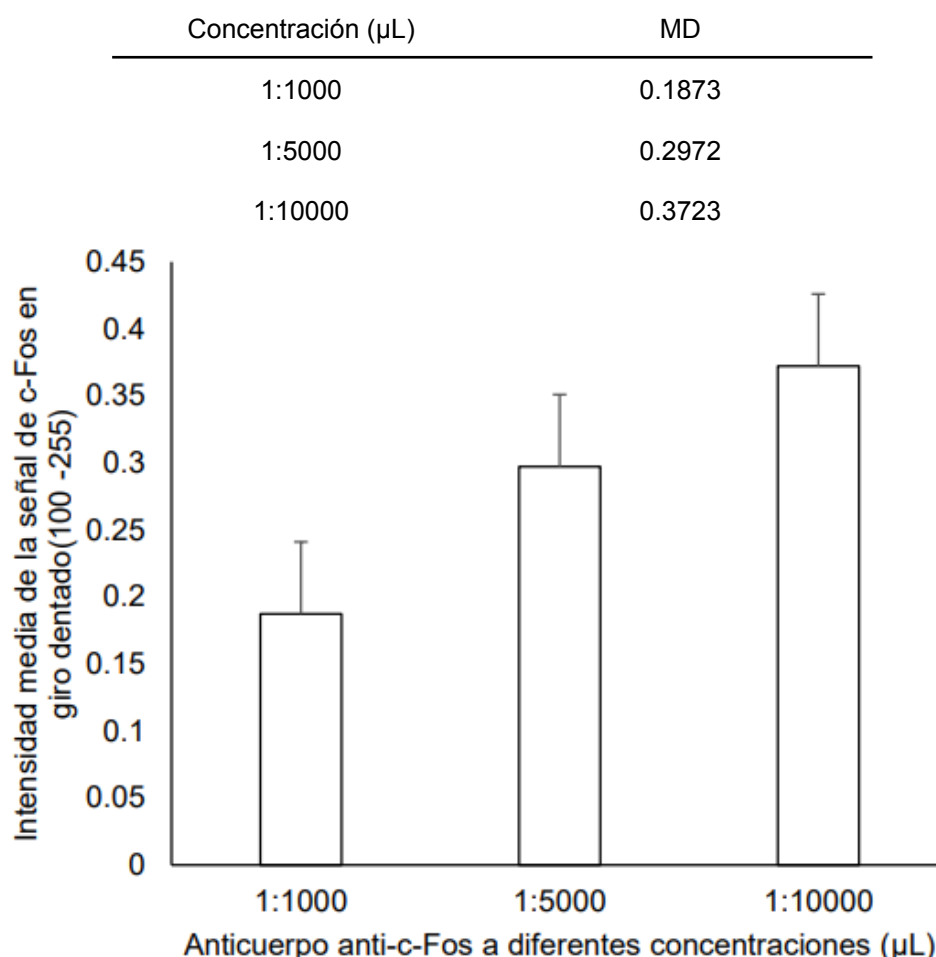


Figura 4.7. Histograma de la intensidad media de la señal de c-Fos en giro dentado (100-255) para cada una de las concentraciones experimentales (1:1000, 1:5000, 1:10000). Solo se representa la media de intensidad de señal de una única célula c-Fos+ con su error estándar. La media de la intensidad de señal de cada una de las células c-Fos+ fue normalizada con su correspondiente área.

5. DISCUSIÓN

El objetivo principal de este trabajo es establecer y optimizar la tecnología del engram. Por este propósito, se estudió la detección de la expresión de EGFP y de c-Fos, utilizando tinciones inmunohistoquímicas a diferentes concentraciones. El análisis de la tinción EGFP de las engram cells reveló la ausencia de diferencias significativas entre las tres concentraciones utilizadas (1:1000, 1:5000, 1:10000) en los parámetros intensidad de la señal y densidad de engram cells. Además, se evaluó la especificidad y sensibilidad de la tinción c-Fos para la identificación de engram cells, comparando la intensidad media de señal en tres concentraciones diferentes (1:1000, 1:5000, 1:10000). Todas las concentraciones mostraron similar eficiencia en la detección de células c-Fos+.

5.1. Experimento 1. Experimento 1. Análisis del marcaje de EGFP en *engram cells* a diferentes concentraciones del anticuerpo anti-GFP.

5.1.1. Intensidad media de la señal de EGFP.

A priori, se esperaba que la única posible concentración adecuada para el marcaje de *engram cells* sería la correspondiente a la concentración 1:1000 debido a que, al ser la de mayor concentración, habría más anticuerpo disponible para reaccionar con el tejido. Asimismo, porque se ha utilizado esta concentración en estudios similares que utilizan el anticuerpo anti-GFP en el tejido cerebral de ratón (Doyle *et al.*, 2003; Nolte *et al.*, 2001). A nivel cualitativo, la señal de GFP ciertamente es más intensa en la dilución 1:1000, pero sigue siendo claramente detectable en las diluciones 1:5000 y 1:10000 (Fig 4.2.). A nivel cuantitativo, la estadística aquí descrita (test de Kruskal Wallis) indica que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las tres condiciones experimentales utilizadas (Tabla 4.1. y Fig 4.3.). Por lo que, tras evaluar el efecto de estas diferentes concentraciones (1:1000, 1:5000, 1:10000) del anticuerpo anti-GFP en los cortes cerebrales de ratón y la confirmación de que no hubo ningún tipo de señal inespecífica (evidenciado en el control negativo), se puede establecer que la concentración 1:10000 es la más óptima para la realización de la tinción inmunohistoquímica. Sin embargo, la ausencia de significación estadística puede atribuirse al escaso tamaño muestral ($n=2$ por concentración), lo cual limita el estudio estadístico y puede ocultar diferencias significativas.

El análisis de la intensidad media de señal permite cuantificar el nivel de activación de *engram cells* en la región del hipocampo. No obstante, se destaca que el valor medio de intensidad no permite por sí solo distinguir si esta activación se debe a una población moderada de neuronas con señal homogénea o a unas pocas neuronas con alta intensidad de marcaje. Lo que resalta la importancia de complementar los análisis de intensidad con otras métricas, como la determinación medio del área a nivel individual de *engram cells*.

5.1.2. Densidad de engram cells dentro del hipocampo

La densidad de las *engram cells* (Nº de *engram cells*/DAPI⁺) dentro del giro dentado fue similar entre las distintas concentraciones analizadas del anticuerpo anti-GFP, sin observarse diferencias apreciables (Fig.4.4). Tras el estudio estadístico (test de Kruskal Wallis), se confirmó la inexistencia de diferencias significativas ($p>0.05$) (Tabla 4.2. y Fig.4.5). Sin embargo, el tamaño muestral utilizado fue reducido ($n=2$ por concentración), lo cual limita la interpretación estadística. Las variaciones individuales entre animales, así como la propia heterogeneidad espacial dentro del hipocampo (por ejemplo, entre subregiones como CA1, CA3, DG) (Witter, 2007), pueden tener un impacto relevante a la hora de determinar la densidad y distribución de las *engram cells*. Por esto mismo, para hacer un estudio lo más correcto posible, es de vital importancia tener en cuenta las variaciones individuales del animal. Si a futuro se realizarán estudios con un tamaño muestral más amplio y se concluye que sigue sin existir diferencias significativas, se podría establecer un valor de referencia estándar para facilitar la rapidez y efectividad del protocolo.

5.2. Experimento 2. Análisis del marcaje de c-Fos en células c-Fos⁺, a diferentes concentraciones del anticuerpo anti-c-Fos.

5.2.1. Análisis semi-cuantitativo del marcaje de c-Fos en células c-Fos⁺.

Por limitaciones de tiempo de uso del microscopio confocal, no se realizó un conteo exhaustivo de todas las neuronas c-Fos⁺ en las muestras. A pesar de ello, se identificó al menos una célula c-Fos⁺ en todos los casos experimentales (concentraciones de anticuerpo anti-c-Fos a: 1:1000, 1:5000 y 1:10000), excepto, en el control (Fig. 4.6). Lo que permitió realizar un análisis semi-cuantitativo: por un

lado, la presencia o ausencia de células c-Fos⁺ (cualitativo); y por otro lado, la medición del nivel de intensidad media de fluorescencia (100-255) que representa cada célula utilizando FIJI (cuantitativo). A nivel cualitativo, se observó que en todas las muestras sometidas a diferentes concentraciones del anticuerpo anti-c-Fos se pudo identificar una célula c-Fos⁺ sin señal de fondo inespecífica. A nivel cuantitativo, no se pudo realizar ningún test estadístico por la falta de tamaño muestral. Pese a ello, sí se pudo realizar un histograma, cuya representación revela que la intensidad media de señal detectada es casi similar en casi todas las concentraciones, siendo incluso la de 1:10000 la de mayor señal (Tabla 4.3. y Fig.4.7). Esto, aunque, pueda parecer contradictorio, debido a que, se debe esperar una relación inversamente proporcional entre la concentración del anticuerpo con respecto a la intensidad de la señal, se debe a la diferencia de tamaño de las *engram cells*, siendo la *engram cell* marcada en la concentración 1:10000 la de mayor tamaño. Ante estos resultados, se puede establecer que la mejor concentración es la correspondiente a la 1:10000, ya que permite una correcta visualización de las células c-Fos⁺ a la menor concentración posible.

Para estudios posteriores, sería interesante, además de aumentar el tamaño muestral, poder contabilizar el número total de células c-Fos⁺ dentro del giro dentado para obtener una medida más exacta de la activación neuronal dentro de esta área.

6. CONCLUSIONES.

6.1. Aplicación y optimización de la tecnología del engram en tejido cerebral de ratón.

Con respecto al objetivo principal, en este trabajo se consiguió aplicar y optimizar exitosamente la tecnología del engram en tejido cerebral de ratón. Esto quedó evidenciado tanto por la detección de señal en ambas tinciones inmunohistoquímicas (anti-GFP y anti-c-Fos) como por la determinación de la concentración (1:1000) más adecuada para ambos casos.

6.2. Optimización de la técnica de inmunohistoquímica para EGFP.

Se mejoró la técnica de inmunohistoquímica para la detección de la señal de EGFP de *engram cells*, mediante la experimentación de diferentes concentraciones de

anticuerpo anti-GFP, que permitieron determinar que la concentración 1:10000 sería suficiente para el marcaje de estas células.

6.3. Análisis de la intensidad media de señal en las engram cells.

Se analizó la intensidad media de la señal en *engram cells* mediante la detección y cuantificación de *engram cells* (EGFP⁺) en DG.

6.4. Análisis de la densidad de *engram cells* (EGFP⁺) dentro del área del hipocampo.

Se realizó el análisis de la densidad de *engram cells* mediante la detección y cuantificación de *engram cells* (EGFP⁺) con respecto al número total de células de la granulosa del giro dentado (DAPI⁺).

6.5. Optimizar la técnica de inmunohistoquímica de c-Fos en tejido cerebral de ratón.

Se mejoró la técnica de inmunohistoquímica para la detección de la señal de c-Fos en células del giro dentado, mediante la experimentación de diferentes concentraciones de anticuerpo anti-c-Fos, que permitieron determinar que la concentración 1:10000 sería suficiente para el marcaje de estas células.

6.6. Análisis semi-cuantitativo de c-Fos en el tejido cerebral de ratón.

Se pudo analizar semi-cuantitativamente las células c-Fos⁺, mediante la presencia o ausencia de la señalización por parte de estas células en el DG (cualitativo) y su intensidad media de señal (cuantitativo).

7. BIBLIOGRAFÍA.

- Amaral, D. G., Scharfman, H. E., & Lavenex, P. (2007). The dentate gyrus: Fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Progress in Brain Research*, 163, 3-22.
[https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)63001-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)63001-5)
- Asok, A., Leroy, F., Rayman, J. B., & Kandel, E. R. (2019). Molecular Mechanisms of the Memory Trace. *Trends in Neurosciences*, 42(1), 14-22.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.10.005>

- Atucha, E., Ku, S.-P., Lippert, M. T., & Sauvage, M. M. (2023). Recalling gist memory depends on CA1 hippocampal neurons for lifetime retention and CA3 neurons for memory precision. *Cell Reports*, 42(11), 113317. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.113317>
- Bear, M. F., author. (2016). *Neuroscience: Exploring the brain*. Fourth edition. Philadelphia : Wolters Kluwer, [2016] ©2016. <https://search.library.wisc.edu/catalog/9911150109902121>
- Berglund, K., Stern, M. A., & Gross, R. E. (2021). Bioluminescence-Optogenetics. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1293, 281-293. https://doi.org/10.1007/978-981-15-8763-4_17
- Biały, M., & Kaczmarek, L. (1996). C-fos expression as a tool to search for the neurobiological base of the sexual behaviour of males. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 56(2), Article 2. <https://doi.org/10.55782/ane-1996-1162>
- Choi, J.-H., Sim, S.-E., Kim, J.-I., Choi, D. I., Oh, J., Ye, S., Lee, J., Kim, T., Ko, H.-G., Lim, C.-S., & Kaang, B.-K. (2018). Interregional synaptic maps among engram cells underlie memory formation. *Science (New York, N.Y.)*, 360(6387), 430-435. <https://doi.org/10.1126/science.aas9204>
- Day, J. J., & Sweatt, J. D. (2011). Epigenetic mechanisms in cognition. *Neuron*, 70(5), 813-829. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.019>
- De Bundel, D., Smolders, I., Vanderheyden, P., & Michotte, Y. (2008). Ang II and Ang IV: Unraveling the mechanism of action on synaptic plasticity, memory, and epilepsy. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 14(4), 315-339. <https://doi.org/10.1111/j.1755-5949.2008.00057.x>

- Dong, C., Madar, A. D., & Sheffield, M. E. J. (2021). Distinct place cell dynamics in CA1 and CA3 encode experience in new environments. *Nature Communications*, 12(1), 2977. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23260-3>
- Doyle, K. P., Simon, R. P., Snyder, A., & Stenzel-Poore, M. P. (2003). Working with GFP in the Brain. *BioTechniques*, 34(3), 492-494. <https://doi.org/10.2144/03343bm08>
- Dudai, Y., Karni, A., & Born, J. (2015). The Consolidation and Transformation of Memory. *Neuron*, 88(1), 20-32. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.09.004>
- Gouveia, F., Camins, A., Ettcheto, M., Bicker, J., Falcão, A., Cruz, M. T., & Fortuna, A. (2022). Targeting brain Renin-Angiotensin System for the prevention and treatment of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Ageing Research Reviews*, 77, 101612. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2022.101612>
- Hannula, D. E., Tranel, D., & Cohen, N. J. (2006). The long and the short of it: Relational memory impairments in amnesia, even at short lags. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(32), 8352-8359. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5222-05.2006>
- Herrera, D. G., & Robertson, H. A. (1996). Activation of c-fos in the brain. *Progress in Neurobiology*, 50(2-3), 83-107. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(96\)00021-4](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(96)00021-4)
- Inagaki, S., Tsutsui, H., Suzuki, K., Agetsuma, M., Arai, Y., Jinno, Y., Bai, G., Daniels, M. J., Okamura, Y., Matsuda, T., & Nagai, T. (2017). Genetically encoded bioluminescent voltage indicator for multi-purpose use in wide range of bioimaging. *Scientific Reports*, 7(1), 42398. <https://doi.org/10.1038/srep42398>

- Josselyn, S. A., & Tonegawa, S. (2020). Memory engrams: Recalling the past and imagining the future. *Science (New York, N.Y.)*, 367(6473), eaaw4325. <https://doi.org/10.1126/science.aaw4325>
- Knierim, J. J. (2015). The hippocampus. *Current Biology: CB*, 25(23), R1116-1121. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.10.049>
- Knoblauch, A., & Sommer, F. T. (2016). Structural Plasticity, Effectual Connectivity, and Memory in Cortex. *Frontiers in Neuroanatomy*, 10, 63. <https://doi.org/10.3389/fnana.2016.00063>
- Li, S., Zhang, J., Li, J., Hu, Y., Zhang, M., & Wang, H. (2025). Optogenetics and chemogenetics: Key tools for modulating neural circuits in rodent models of depression. *Frontiers in Neural Circuits*, 19, 1516839. <https://doi.org/10.3389/fncir.2025.1516839>
- Liu, X., Ramirez, S., Pang, P. T., Puryear, C. B., Govindarajan, A., Deisseroth, K., & Tonegawa, S. (2012). Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall. *Nature*, 484(7394), 381-385. <https://doi.org/10.1038/nature11028>
- Lu, J., Zhang, Z., Yin, X., Tang, Y., Ji, R., Chen, H., Guang, Y., Gong, X., He, Y., Zhou, W., Wang, H., Cheng, K., Wang, Y., Chen, X., Xie, P., & Guo, Z. V. (2022). An entorhinal-visual cortical circuit regulates depression-like behaviors. *Molecular Psychiatry*, 27(9), 3807-3820. <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01540-8>
- McGaugh, J. L. (2000). Memory—A century of consolidation. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5451), 248-251. <https://doi.org/10.1126/science.287.5451.248>

- Messaoudi, E., Kanhema, T., Soulé, J., Tiron, A., Dagyte, G., da Silva, B., & Bramham, C. R. (2007). Sustained Arc/Arg3.1 synthesis controls long-term potentiation consolidation through regulation of local actin polymerization in the dentate gyrus in vivo. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(39), 10445-10455. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2883-07.2007>
- Meyer, M. A. A., & Radulovic, J. (2021). Functional differentiation in the transverse plane of the hippocampus: An update on activity segregation within the DG and CA3 subfields. *Brain Research Bulletin*, 171, 35-43. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2021.03.003>
- Moreau, A. W., & Kullmann, D. M. (2013). NMDA receptor-dependent function and plasticity in inhibitory circuits. *Neuropharmacology*, 74, 23-31. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.03.004>
- Morris, R. G. M. (2013). NMDA receptors and memory encoding. *Neuropharmacology*, 74, 32-40. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.04.014>
- Najenson, J. (2021). What have we learned about the engram? *Synthese*, 199(3), 9581-9601. <https://doi.org/10.1007/s11229-021-03216-2>
- Nolte, C., Matyash, M., Pivneva, T., Schipke, C. G., Ohlemeyer, C., Hanisch, U.-K., Kirchhoff, F., & Kettenmann, H. (2001). GFAP promoter-controlled EGFP-expressing transgenic mice: A tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue. *Glia*, 33(1), 72-86. [https://doi.org/10.1002/1098-1136\(20010101\)33:1<72::AID-GLIA1007>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/1098-1136(20010101)33:1<72::AID-GLIA1007>3.0.CO;2-A)

- Ortega-de San Luis, C., & Ryan, T. J. (2022). Understanding the physical basis of memory: Molecular mechanisms of the engram. *The Journal of Biological Chemistry*, 298(5), 101866. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101866>
- Paxinos, G., & Franklin, K. B. J. (2001). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press. <https://books.google.es/books?id=tZdjQgAACAAJ>
- Place, R., Lykken, C., Beer, Z., Suh, J., McHugh, T. J., Tonegawa, S., Eichenbaum, H., & Sauvage, M. M. (2012). NMDA signaling in CA1 mediates selectively the spatial component of episodic memory. *Learning & Memory*, 19(4), 164-169. <https://doi.org/10.1101/lm.025254.111>
- Pláteník, J., Kuramoto, N., & Yoneda, Y. (2000). Molecular mechanisms associated with long-term consolidation of the NMDA signals. *Life Sciences*, 67(4), 335-364. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(00\)00632-9](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(00)00632-9)
- Rangel, C. A. S. (s. f.). *QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO*.
- Rawat, R., Tunc-Ozcan, E., McGuire, T. L., Peng, C.-Y., & Kessler, J. A. (2022). Ketamine activates adult-born immature granule neurons to rapidly alleviate depression-like behaviors in mice. *Nature Communications*, 13(1), 2650. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30386-5>
- Reijmers, L. G., Perkins, B. L., Matsuo, N., & Mayford, M. (2007). Localization of a stable neural correlate of associative memory. *Science (New York, N.Y.)*, 317(5842), 1230-1233. <https://doi.org/10.1126/science.1143839>
- Roy, D. S., Arons, A., Mitchell, T. I., Pignatelli, M., Ryan, T. J., & Tonegawa, S. (2016). Memory retrieval by activating engram cells in mouse models of early Alzheimer's disease. *Nature*, 531(7595), 508-512. <https://doi.org/10.1038/nature17172>

- Ryan, T. J., Roy, D. S., Pignatelli, M., Arons, A., & Tonegawa, S. (2015). Memory. Engram cells retain memory under retrograde amnesia. *Science (New York, N.Y.)*, 348(6238), 1007-1013. <https://doi.org/10.1126/science.aaa5542>
- Sakai, D., Tomita, H., & Maeda, A. (2022). Optogenetic Therapy for Visual Restoration. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23), 15041. <https://doi.org/10.3390/ijms232315041>
- Semon, R. (1925). THE MNEME. *The Journal of Nervous and Mental Disease*, 62(3), 332.
- Tonegawa, S., Liu, X., Ramirez, S., & Redondo, R. (2015). Memory Engram Cells Have Come of Age. *Neuron*, 87(5), 918-931. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.08.002>
- Wang, H., Hu, Y., & Tsien, J. Z. (2006). Molecular and systems mechanisms of memory consolidation and storage. *Progress in Neurobiology*, 79(3), 123-135. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2006.06.004>
- Warren, D. E., Duff, M. C., Jensen, U., Tranel, D., & Cohen, N. J. (2012). Hiding in plain view: Lesions of the medial temporal lobe impair online representation. *Hippocampus*, 22(7), 1577-1588. <https://doi.org/10.1002/hipo.21000>
- Wible, C. G. (2013). Hippocampal Physiology, Structure and Function and the Neuroscience of Schizophrenia: A Unified Account of Declarative Memory Deficits, Working Memory Deficits and Schizophrenic Symptoms. *Behavioral Sciences*, 3(2), 298-315. <https://doi.org/10.3390/bs3020298>

- Witter, M. P. (2007). The perforant path: Projections from the entorhinal cortex to the dentate gyrus. *Progress in Brain Research*, 163, 43-61.
[https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)63003-9](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)63003-9)
- Zhou, Q., & Sheng, M. (2013). NMDA receptors in nervous system diseases. *Neuropharmacology*, 74, 69-75.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.03.030>