



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO de CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

*REPROGRAMACIÓN CELULAR Y REJUVENECIMIENTO:
APLICACIÓN EN EL CEREBRO SENIL*

Tesista: Martina Canatelli Mallat

Director: Rodolfo Gustavo Goya

Director conjunto: Gustavo Ramón Morel

Año: 2023

Para mi papá ♥

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP) de la Facultad de Ciencias Médicas (FCM), Universidad Nacional de La Plata (UNLP), por haberme brindado el espacio y los medios para la ejecución de esta tesis.

A las Instituciones que han financiado mi trabajo de investigación:

- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)
- Universidad Nacional de La Plata (UNLP)
- Ministerio de Ciencia y Técnica (MinCyT)

A mis directores, Rodolfo y Gustavo, por su aporte en el diseño y ejecución de esta tesis.

A Nane y Pri, hermanas de la vida que me regaló este doctorado. Sin ustedes no hubiera podido llegar hasta acá, no sólo por todo el trabajo hecho en conjunto, sino también por el apoyo emocional que siempre me brindaron. Gracias por ser el tronco perfecto.

A mi gran y hermoso grupo de amigos, sin lugar a dudas lo más lindo que me deja este doctorado: Nati, Eushi, Flor, Ju, Ara, Fran, Nane y Pri nuevamente, y los +1: Luis, Eze, Manu el mago, Leo y Mati. Gracias por su apoyo incondicional y por todos los momentos compartidos.

A todos los integrantes del laboratorio, Cami, Facu, Daniel, Joa, y especialmente Jole y Pau, por guiarme y aconsejarme cada vez que lo necesité.

A Sofi y a Justo, por permitirme tener un cable a tierra y ayudarme a afrontar cualquier situación.

A mis amigos biotecnólogos fuera del laboratorio, Karen, Edu y Santi. Gracias por estar firmes a mi lado durante todo este proceso, ya sea mate de por medio o a la distancia.

A Michele y Jim, mis papás irlandeses, por brindarme un hogar durante tres meses que fueron cruciales para la escritura de esta tesis y por todas las palabras de aliento que me dieron. Y a Archie, por ser mi fiel compañero durante cada uno de esos días de escritura.

A mis cuñados y cuñadas, Gugi, Fran, Meli y Sole, por estar siempre. Y a mi hermosa sobrina, Oli, por sacarme una sonrisa cada día con sus nuevas locuras y llenarme el corazón.

A mis suegros, Car y Rober, por ser mis segundos papás, por alentarme en cada paso y estar para mí en las buenas y en las malas.

A mi abuela Mara y mi tío Ale, por estar siempre a pesar de la distancia y por creer en mí.

A los que ya no están, pero llevo y llevaré siempre en mi corazón. A mi Nonna, mi abuelo y mi tío Franco, gracias por todo lo lindo que me dejaron. Y a mi papá, Norberto, por haberla peleado con tanta fuerza hasta el final y haber podido estar en uno de los momentos más importantes de mi vida. Hoy ya no estás físicamente, pero te llevo conmigo más que nunca.

A mi mamá, Sandra, por los valores que me inculcó, por alentarme y apoyarme en todo y por brindarme tanto amor.

A mi hermanita, Luisana, por estar incondicionalmente en cada momento, escuchando, aconsejando, alentando, o simplemente con unos mates/abrazos sanadores.

A mi amor, Manu, por ser mi compañero de vida, mi pilar en absolutamente todo, por alegrar cada uno de mis días, por creer en mí más que nadie y por hacerme sentir que puedo siempre. Hoy, en gran parte gracias a vos, pude.

Trabajos científicos derivados de esta tesis

Publicaciones del grupo y de colaboraciones:

Canatelli Mallat, M., Chiavellini, P., Lehmann, M., Goya, R. G., & Morel, G. R. (2022). Age-related loss of recognition memory and its correlation with hippocampal and perirhinal cortex changes in female Sprague Dawley rats. *Behavioural brain research*, 435, 114026. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2022.114026>

Chiavellini, P., Lehmann, M., **Canatelli Mallat, M.**, Zoller, J. A., Herenu, C. B., Morel, G. R., Horvath, S., & Goya, R. G. (2022). Hippocampal DNA Methylation, Epigenetic Age, and Spatial Memory Performance in Young and Old Rats. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 77(12), 2387–2394. <https://doi.org/10.1093/gerona/glac153>

Horvath, S., Singh, K., Raj, K., Khairnar, S., Sanghavi, A., Shrivastava, A., Zoller, J.A., Li, C.Z., Herenu, C.B., **Canatelli Mallat, M.**, Lehmann, M., Solberg Woods, L.C., Garcia Martinez, A., Wang, T., Chiavellini, P., Levine, A.J., Chen, H., Goya, R.G., & Katcher, H.L. (2020). Reversing age: dual species measurement of epigenetic age with a single clock. *bioRxiv* (preprint). <https://doi.org/10.1101/2020.05.07.082917>

Canatelli Mallat, M., Lascaray, F., Entraigues-Abramson, M., Portiansky, E. L., Blamaceda, N., Morel, G. R., & Goya, R. G. (2020). Cryopreservation of a Human Brain and Its Experimental Correlate in Rats. *Rejuvenation research*, 23(6), 516–525. <https://doi.org/10.1089/rej.2019.2245>

Lehmann, M., **Canatelli Mallat, M.**, Chiavellini, P., Morel, G. R., Reggiani, P. C., Hereñú, C. B., & Goya, R. G. (2019). Regulatable adenovector harboring the GFP and Yamanaka genes for implementing regenerative medicine in the brain. *Gene therapy*, 26(10-11), 432–440. <https://doi.org/10.1038/s41434-019-0063-x>

Presentaciones en reuniones científicas nacionales e internacionales:

Canatelli Mallat, M., Chiavellini, P., Lehmann, M., Pasquini, C., Gallardo, M.D., Morel, G.R., & Goya, R.G. Implementation of Yamanaka genes in the senile rat hippocampus to restore cognitive function. Use of gene transfer as a therapeutic strategy symposium, Reunión Anual de Sociedades de Biociencia. Mar del Plata, Argentina; 16 a 19 de noviembre de 2022.

Canatelli Mallat, M., Chiavellini, P., Lehmann, M., Goya, R.G., & Morel, G.R. Pattern Separation performance and hippocampal neurogenesis in aged female rats. Neuromatch 3.0 (charla interactiva); 26 a 30 de octubre de 2020.

Canatelli Mallat, M., Chiavellini, P., Lehmann, M., Goya, R.G., & Morel, G.R. Pattern Separation performance and hippocampal neurogenesis in old female rats. FENS virtual Forum (Poster); 11 a 15 de julio de 2020.

Canatelli Mallat, M., Chiavellini, P., Lehmann, M., Morel, G.R., & Goya, R.G. Behavioral pattern separation performance and hippocampal Doublecortin neuron analysis in very old female rats. Reunión Anual de Sociedades de Biociencia (Poster). Mar del Plata, Argentina; 13 a 16 de noviembre de 2019.

Nomenclatura.....	10
Resumen.....	11
Capítulo I: Introducción.....	12
1.1 Envejecimiento.....	12
1.1.1 Envejecimiento a nivel cerebral.....	12
Cambios en las sinapsis.....	12
1.1.2 Envejecimiento a nivel cerebral en la rata.....	14
1.1.3 Teorías de envejecimiento.....	14
Daño oxidativo.....	14
Daño acumulativo del ADN.....	15
Acortamiento de telómeros.....	15
Pérdida de proteostasis.....	15
Teoría epigenética.....	15
1.2 Epigenética.....	16
1.2.1 Metilación del ADN.....	16
1.2.2 Teoría del reloj epigenético.....	18
1.3 Reprogramación celular.....	21
1.4 Terapia génica.....	24
1.4.1 Vectores como métodos de transferencia.....	24
Vectores virales.....	25
1.5 Memoria y aprendizaje.....	29
1.5.1 Breve historia del estudio de la memoria.....	29
1.5.2 ¿Dónde ocurre el proceso?.....	30
1.5.3 El engrama.....	32
1.5.4 Separación y terminación/finalización de patrones.....	33
1.6 Criopreservación.....	33
Capítulo II: Hipótesis y objetivos.....	35
Capítulo III: Construcción y caracterización del virus HD-OSKM.....	36
3.1 Objetivos específicos.....	36
3.2 Materiales y métodos.....	36
3.2.1 Plásmido pC4HSU-STEMCCA-tTA.....	36
3.2.2 Generación del genoma viral.....	37
3.2.3 Cultivo de la línea celular HEK293 Cre.....	38
3.2.4 Virus auxiliar H14.....	38

3.2.5 Generación del virus.....	39
3.2.6 Amplificación del virus	40
3.2.7 Purificación del virus	40
Obtención del lisado crudo	41
Ultracentrifugación en gradiente de CsCl.....	41
Ultracentrifugación en gradiente isopícnico de CsCl 1,35 g/ml	41
Diálisis.....	42
Fraccionamiento y almacenaje.....	42
3.2.8 Titulación del virus por espectrofotometría	42
3.2.9 Cultivo primario de fibroblastos.....	42
3.2.10 Medida de la fluorescencia en el tiempo.....	43
3.2.11 Curva dosis respuesta	43
3.2.12 Inmunocitoquímica	44
Chequeo de expresión de los genes de pluripotencia en las células transducidas.....	44
Evaluación del efecto terapéutico del virus en las células transducidas.....	44
3.2.13 Obtención y análisis de imágenes	45
3.2.14 Análisis estadístico	46
3.3 Resultados	46
3.3.1 Generación del virus.....	46
3.3.2 Amplificación del virus	46
3.3.3 Purificación del virus	47
3.3.4 Titulación del virus por espectrofotometría	48
3.3.5 Cultivo primario de fibroblastos.....	48
3.3.6 Medida de la fluorescencia en el tiempo.....	49
3.3.7 Curva dosis respuesta	49
3.3.8 Inmunocitoquímica	50
Chequeo de expresión de los genes de pluripotencia en las células transducidas.....	50
Evaluación del efecto terapéutico del virus en las células transducidas.....	50
3.4 Discusión	52
3.5 Conclusiones.....	56
Capítulo IV: Caracterización del modelo animal	57
4.1 Objetivo específico	57
4.2 Materiales y métodos.....	57
4.2.1 Animales.....	57

4.2.2 Pruebas comportamentales	57
Test de reconocimiento espontáneo de la localización del objeto (SLR).....	57
Test de reconocimiento espontáneo de la característica del objeto (SOR).....	59
4.2.3 Perfusión y procesamiento de los cerebros.....	60
4.2.4 Inmunohistoquímica	60
4.2.5 Obtención y análisis de imágenes	61
Análisis de neuroblastos.....	61
Análisis de neuronas maduras.....	62
Análisis de células de la microglía	62
4.2.6 Análisis estadístico	62
4.3 Resultados	63
4.3.1 Pruebas comportamentales	63
Test de reconocimiento espontáneo de la localización del objeto (SLR).....	63
Test de reconocimiento espontáneo de la característica del objeto (SOR).....	64
4.3.2 Análisis de imágenes	67
Análisis de neuroblastos.....	67
Análisis de neuronas maduras.....	67
Análisis de células de la microglía	69
Correlación entre los cambios celulares y las pruebas de memoria	71
4.4 Discusión	72
4.5 Conclusiones.....	77
Capítulo V: Puesta a punto del reloj epigenético en rata	78
5.1 Objetivo específico	78
5.2 Materiales y métodos.....	78
5.2.1 Animales	78
5.2.2 Eutanasia y recolección de muestras	78
Recolección de sangre	78
Disección del cerebro	78
Disección de tejidos.....	80
5.2.3 Puesta a punto del reloj epigenético	81
Muestras.....	81
Extracción de ADN de las muestras.....	81
Perfil de metilación del ADN	82
Modelos de regresión utilizados	83
Estimación de la edad relativa.....	83

5.3 Resultados	84
5.3.1 Relojes desarrollados	84
5.3.2 Reloj multi-tejido de rata	85
5.4 Discusión	86
5.5 Conclusiones.....	90
Capítulo VI: Terapia génica regenerativa con OSKM en el hipocampo de la rata senil.....	91
6.1 Objetivo específico	91
6.2 Materiales y métodos.....	91
6.2.1 Animales.....	91
6.2.2 Cirugía estereotáxica.....	91
6.2.3 Pruebas comportamentales	93
Test de reconocimiento espontáneo de la localización del objeto (SLR).....	93
Test de Barnes	93
6.2.4 Eutanasia y procesamiento de los cerebros	94
6.2.5 Diseño experimental	94
6.2.6 Inmunohistoquímica	95
Chequeo de expresión de Oct4 en el hipocampo de las ratas inyectadas con el HD-OSKM.....	95
Evaluación del efecto terapéutico del virus en los cerebros tratados.....	96
6.2.7 Obtención y análisis de imágenes	96
Análisis de neuroblastos.....	97
Análisis de botones sinápticos.....	97
6.2.8 Análisis estadístico	97
6.2.9 Análisis del perfil epigenético	98
6.3 Resultados	98
6.3.1 Expresión del virus en el hipocampo	98
6.3.2 Pruebas comportamentales	99
Test de reconocimiento espontáneo de la localización del objeto (SLR).....	99
Barnes.....	100
6.3.3 Análisis de imágenes	101
Análisis de neuroblastos.....	101
Análisis de botones sinápticos.....	101
6.3.4 Análisis de la metilación del hipocampo.....	102
6.4 Discusión	103
6.5 Conclusiones.....	107

Capítulo VII: Criopreservación de los cerebros	108
7.1 Objetivo específico	108
7.2 Materiales y métodos.....	108
7.2.1 Animales	108
7.2.2 Soluciones para la perfusión	108
7.2.3 Perfusión y procesamiento de los cerebros.....	109
7.2.4 Medición del índice de refracción del efluente	109
7.2.5 Inmunohistoquímica	110
7.2.6 Obtención y análisis de imágenes	111
Espesor de la corteza y del hipocampo	111
Análisis de neuronas maduras.....	111
Análisis de neuroblastos.....	111
Análisis de botones sinápticos.....	111
Análisis estadístico.....	111
7.3 Resultados	112
7.3.1 Temperatura de los cerebros durante la perfusión	112
7.3.2 Índice de refracción del efluente	112
7.3.3 Peso y medida de los cerebros.....	113
7.3.4 Inmunohistoquímica	113
Espesor de la corteza y del hipocampo	113
Análisis de neuronas maduras.....	114
Análisis de neuroblastos.....	115
Análisis de botones sinápticos.....	115
7.4 Discusión	116
7.5 Conclusiones.....	117
Capítulo VIII: Conclusiones generales	118
Bibliografía	121

Nomenclatura

53BP1: *p53 Binding Protein 1*

Ad: adenovirus

ADN: ácido desoxirribonucleico

AMPA: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

ARN: ácido ribonucleico

Asf: fracción de muestreo del área

AT: *acquisition trial*

ATB/ATM: antibiótico/antimicótico

CA: *cornu amonis*

Cc: cuerpo caloso

CMV: citomegalovirus

c-Myc: factor de transcripción del proto-oncogén MYC

CpG: dinucleótidos citosina-guanina

Cx: corteza

DAB: 3,3-diamino bencidina tretrahidrocloreuro

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DCX: doblecortina

DG: giro dentado

dh: *dentate hilus*

DMSO: dimetil-sulfóxido

DNMT: ADN metiltransferasa

DOX: doxiciclina

EC: corteza entorrinal

ECM: matriz extracelular

ECP: efecto citopático

EG: etilenglicol

EI: intermediario epigenéticamente inestable

ESC: célula madre embrionaria

FT: factor de transcripción

GFP: proteína verde fluorescente

GCL: capa celular granular

H2Ax: variante de la familia de histonas H2A

HD-OSKM: adenovirus dependiente de auxiliar OSKM

Hip: hipocampo

ICM: masa celular interna

ICQ: inmunocitoquímica

IHQ: inmunohistoquímica

iPSC: célula pluripotente inducida

IRES: sitio interno de reconocimiento de ribosoma

ITRs: repeticiones terminales invertidas

Kl4: factor 4 *Kruppel-like*

MPP: vía perforante medial

LAP2: polipéptido 2 asociado a la lámina nuclear

LCV: lisado crudo viral

LPP: vía perforante lateral

MBH: hipotálamo medio basal

MSBs: *multiple-synapse boutons*

NeuN: antígeno nuclear neuronal

NMDA: N-metil-D-aspartato

NSBs: *non-synapse boutons*

NSC: *neural stem cell*

Oct4: *octamer-binding transcription factor 4*

OSK: *oct4, sox2* y *klf4*

OSKM: *oct4, sox2, klf4* y *c-myc*

PBS: buffer fosfato salino

PFA: paraformaldehído

pfu: unidades formadoras de placa

PNN: redes perineuronales

PP: vía perforante

PRh: corteza perirrinal

PT: *probe trial*

RAd: adenovirus recombinante

rf: fisura rinal

ROS: especies reactivas de oxígeno

SD: Sprague-Dawley

SFB: suero fetal bovino

SGZ: zona subgranular

Sl: *stratum lucidum*

SLR: test de reconocimiento espontáneo de la localización del objeto

SNC: suero normal de caballo

SOR: test de reconocimiento espontáneo de la característica del objeto

Sox2: *sex determining Region Y-box 2*

Spy: *stratum pyramidale*

SSBs: *single-synapse boutons*

Ssf: fracción de muestreo de la sección

STEMCCA: *stem cell cassette*

Syn: sinaptofisina

RDP: reprogramación directa mediada por factores de pluripotencia

TA: vía temporoamónica

TET: *ten-eleven-translocation*

Tsf: fracción de muestreo del espesor

Ufp: unidades formadoras de placas

Resumen

El envejecimiento es un proceso asociado a un progresivo deterioro del aprendizaje y la memoria espacial y de reconocimiento, ocasionado por cambios morfológicos y moleculares en el cerebro, particularmente en el hipocampo – estructura clave en la formación y consolidación de la memoria – y en la corteza perirrinal. La rata senil presenta cambios similares al humano senil en la morfometría de su hipocampo y, además, tiene un desempeño inferior al de la rata joven en pruebas de memoria, lo cual la convierte en un excelente modelo de investigación básica para desarrollar terapias novedosas contra el deterioro cognitivo asociado a la edad. En este contexto surge la implementación de la reprogramación celular mediada por factores de pluripotencia como estrategia terapéutica. Se ha demostrado que la reprogramación celular puede revertir el fenotipo envejecido, logrando un rejuvenecimiento a nivel celular y epigenético. Así, se propuso como principal objetivo de esta tesis la implementación de una terapia que nos permita revertir los cambios degenerativos que ocurren en el cerebro con el envejecimiento. Para ello, desarrollamos en nuestro laboratorio un vector adenoviral portador de 4 genes de pluripotencia, específicamente *oct4*, *sox2*, *klf4* y *c-myc* (OSKM), y del gen de la GFP (*green fluorescent protein*). Este vector fue caracterizado para su posterior uso en estudios de rejuvenecimiento por reprogramación parcial. Se llevó a cabo un protocolo de sobreexpresión de los genes de pluripotencia en fibroblastos de rata senil durante tres días, logrando revertir el fenotipo de uno de tres marcadores epigenéticos evaluados. Posteriormente se caracterizó el modelo biológico utilizado en el laboratorio, la rata hembra Sprague-Dawley, tomando el hipocampo y la corteza perirrinal como las principales zonas de interés. Se llevaron a cabo pruebas cognitivas y se estudiaron varias poblaciones celulares a fin de evaluar si existía alguna relación entre los cambios cognitivos y los cambios morfológicos observados con la edad. Se llegó a la conclusión de que, si bien ambos nodos son de importancia para la memoria espacial y de reconocimiento, el hipocampo es más vulnerable que la corteza perirrinal y presenta una disfunción más temprana, de modo que se lo escogió como blanco para realizar terapia génica con los genes OSKM. Por otro lado, nos propusimos poner a punto un reloj epigenético apto para aplicar en rata, dado que hasta el momento sólo existían relojes de humano y de ratón. Los relojes epigenéticos son biomarcadores de edad muy exactos, que miden la edad biológica del individuo analizando la metilación de un set de CpGs (dinucleótidos citosina-guanina). Esto se llevó a cabo con éxito, en colaboración con el grupo del Dr. Stephen Horvath de la Universidad de California, Estados Unidos. El reloj desarrollado nos permitió demostrar que los cambios asociados a la edad en la metilación de ciertas CpGs se correlacionan con el deterioro en la memoria de los animales. En base a estos resultados procedimos a implementar la terapia génica *in vivo* en el hipocampo de ratas seniles inyectando el adenovector con los genes OSKM. La sobreexpresión de los genes durante 49 días no generó un aumento en la mortalidad de los animales. No se observaron efectos de la terapia sobre la memoria de reconocimiento ni la memoria espacial, pero sí se observó una mejora en el aprendizaje de las ratas. Se estudió también la neurogénesis y las conexiones sinápticas en los cerebros de los animales tratados, aunque no se observaron diferencias significativas en comparación con los animales control, de modo que no fue posible correlacionar la mejora cognitiva con estos parámetros. A su vez, se midió la edad biológica de las muestras, pero sólo se observó diferencia entre las muestras provenientes de ratas jóvenes y las provenientes de ratas seniles (tanto tratadas como control). Como último objetivo de este trabajo de tesis, se buscó poner a punto un método de criopreservación de los cerebros a fin de optimizar su conservación para que en futuros trabajos se puedan estudiar las distintas poblaciones celulares y/o las conexiones entre las neuronas minimizando las variaciones que pueden aumentar el error experimental.

El presente trabajo de tesis doctoral es pionero en el estudio de rejuvenecimiento *in vivo* en hipocampo de rata envejecida y en los efectos de la terapia implementada a nivel cognitivo, resultando de gran relevancia para el campo de la neurociencia.

Capítulo I: Introducción

1.1 Envejecimiento

Hasta el momento, a pesar de que las consecuencias del envejecimiento son evidentes en casi todos los organismos vivos, no existe una definición universalmente aceptada que abarque todos los eventos que ocurren en el mismo. Desde el inicio de la madurez reproductiva de un organismo, el envejecimiento se caracteriza por una disminución de la fecundidad, una mayor susceptibilidad a enfermedades y disfunción de los tejidos y un mayor riesgo de mortalidad (**Kirkwood, 2005; Hayflick, 2007; Kirkwood y Shanley, 2010**). Este proceso está asociado a una pérdida gradual de los mecanismos homeostáticos que mantienen la estructura y la función de los tejidos adultos.

1.1.1 Envejecimiento a nivel cerebral

El envejecimiento cerebral se caracteriza por presentar alteraciones celulares y moleculares que comprenden daño oxidativo, disfunción mitocondrial, inestabilidad genómica, acortamiento de los telómeros, senescencia celular replicativa, reducción del número de células madre, modificaciones epigenéticas, pérdida de proteostasis, alteración de la comunicación celular, desregulación energética, del metabolismo de la glucosa y neuroinflamación crónica (**López-Otín et al., 2013; Aunan et al., 2016**). Estos cambios aparecen lentamente y se acumulan con el tiempo, contribuyendo así al daño de las células nerviosas que finalmente se reflejan en déficits cognitivos y motores, entre otros. Estos déficits se deben, en parte, a cambios a nivel estructural y neurofisiológico que conllevan a una pérdida de eficacia en la neurotransmisión (**Randall et al., 2012**).

Se ha observado una disminución en el volumen cerebral y un aumento del volumen de los ventrículos en individuos envejecidos. La pérdida de volumen cerebral es variable para las distintas regiones del cerebro. Se ha identificado que el hipocampo, la corteza prefrontal, la corteza temporal inferior, el cerebelo y el núcleo estriado presentan una disminución de volumen más pronunciada que el resto del cerebro con el envejecimiento (**Walhovd et al., 2011**). Estos cambios se asocian no sólo a la muerte neuronal sino también a alteraciones en las propiedades celulares intrínsecas de las neuronas tales como reducción del soma (**de Brabander et al., 1998**), regresión o pérdida de espinas dendríticas, disminución en el número de sinapsis (**Chen et al., 1995**), alteraciones en los receptores de neurotransmisores o disminución de la respuesta a los mismos (**Rosene y Nicholson, 1999**) y desmielinización de los axones. En su conjunto, estos factores conducen a una alteración de la conductividad neuronal y constituyen las principales fuerzas impulsoras de la disminución del volumen del cerebro asociada al envejecimiento (**Dickstein et al., 2007**).

Cambios en las sinapsis

El término sinapsis fue utilizado por primera vez por Charles Sherrington para referirse a la conexión entre dos neuronas. Las sinapsis son estructuras altamente lábiles y responden a cambios microambientales en el cerebro, resultando en un continuo refinamiento de los circuitos neuronales (**Adams et al., 1997; Causing et al., 1997**). Esto se conoce como plasticidad sináptica, y es esencial para el almacenamiento de información y para el aprendizaje y la memoria dependientes de la experiencia, así como para otros fenómenos

asociados a la cognición (**Burke y Barnes, 2006**). Como elemento fundamental de la conectividad neuronal, las sinapsis son cruciales para la función cerebral incluyendo el procesamiento y transmisión de información (**Harris, 1999**). Hoy en día se sabe que una sinapsis consta de un componente presináptico y un componente postsináptico. La terminal presináptica contiene grupos de vesículas llenas de neurotransmisores, mientras que la postsináptica contiene receptores específicos para dichos neurotransmisores en su membrana. Se requiere de una red de proteínas complejas para mantener el arreglo preciso de las sinapsis. Las proteínas presinápticas se expresan en cantidades precisas, en localizaciones específicas y con determinadas funciones. La densidad sináptica (cantidad de proteínas sinápticas) es una medida de la sinapsis y depende del balance entre la eliminación y la plasticidad sináptica. Durante el proceso de envejecimiento, los contactos sinápticos se pierden y los mecanismos de reparación de los microcircuitos disfuncionales se vuelven menos efectivos. La cantidad de sinapsis y la eficiencia de las mismas son parámetros que están regulados por la actividad neuronal de forma altamente dinámica (**Nikonenko et al., 2002**), y aquellos cambios sinápticos que se dan de manera sutil son responsables del impacto del envejecimiento en la función neuronal que se manifiestan en el deterioro cognitivo. Sin embargo, estos cambios sinápticos que se dan con la edad dependen del tipo de sinapsis y la zona del cerebro (**Petralia et al., 2014**). Se ha visto que la plasticidad sináptica se ve afectada, por ejemplo, en la corteza prefrontal de monos Rhesus, y que dicha afección podría ser causante de impedimentos en tareas complejas que dependen de la memoria de trabajo y requieren circuitos complejos que han demostrado ser muy vulnerables al envejecimiento (**Rapp y Amaral, 1989; Lyons-Warren et al., 2004; Moore et al., 2006**). No se han dilucidado las interacciones entre los cambios estructurales y funcionales en dicha región cerebral, tales como si la pérdida de espinas dendríticas y los cambios de excitabilidad se contrarrestan o exacerbaban mutuamente, pero sí se ha realizado un análisis de las espinas dendríticas de las neuronas piramidales de la corteza prefrontal. Existen distintas categorías de espinas con distintos roles. Las espinas con forma de hongo tienen una alta concentración de receptores AMPA y un alto grado de estabilidad estructural. Estas espinas median fuertes corrientes sinápticas. Las espinas delgadas se asocian con un alto grado de plasticidad en comparación con las espinas con forma de hongo (**Matsuzaki et al., 2001; Zuo et al., 2005; Holtmaat et al., 2006**). Se ha planteado que las espinas con forma de hongo median recuerdos a largo plazo mientras que las espinas delgadas están más estrechamente asociadas al aprendizaje de nueva información (**Kasai et al., 2003; Bourne y Harris, 2007; Kasai et al., 2010**). Prácticamente toda la pérdida de espinas dendríticas que se da con el envejecimiento se debe a la pérdida de espinas delgadas, ya que durante este proceso se pierde casi la mitad de las mismas, mientras que no hay pérdida de espinas con forma de hongo (**Dumitriu et al., 2010**). Los datos de la corteza prefrontal de rata son menos extensos que los del modelo de primate no humano, tal vez porque la homología anatómica entre la corteza prefrontal de roedor y primate es controvertida (**Preuss y Wise, 2022**). Por otra parte, se han encontrado cambios en el hipocampo de ratas de edad avanzada. Se han informado disminuciones relacionadas con la edad en los receptores NMDA y los receptores AMPA – ambos receptores de glutamato – en esta región (**Shi et al., 2007**). Específicamente, se ha demostrado que la disminución relacionada con el envejecimiento de los receptores NMDA funcionales en ratas conduce a una transmisión sináptica deteriorada. Como los receptores AMPA median la mayor parte de la transmisión sináptica excitatoria rápida y su número es el principal determinante de la eficacia sináptica, una pérdida de estos receptores relacionada con el envejecimiento también se asocia con una transmisión sináptica deteriorada. Además, una expresión disminuida de los

receptores AMPA puede tener un efecto deletéreo sobre la función cognitiva, incluso cuando el número de sinapsis es constante (**Geinisman et al., 2004**). Una pérdida de receptores AMPA puede transformar las sinapsis funcionales en silenciosas durante el envejecimiento y contribuir al deterioro cognitivo relacionado a dicho proceso (**Ganeshina et al., 2004**). De este modo, la disminución de estos receptores induce cambios a nivel celular que terminan afectando la transmisión sináptica, comprometiendo la plasticidad sináptica (**Potier et al., 2000**).

1.1.2 Envejecimiento a nivel cerebral en la rata

En este caso el envejecimiento también es acompañado por procesos degenerativos y/o atróficos, sabiendo que los cambios morfológicos son paralelos a una reducción en la capacidad de aprendizaje espacial (**Fischer et al., 1992; Morel et al., 2015**). Asimismo, existe sólida evidencia de que, en esta especie, la disminución en la capacidad de aprendizaje y en la memoria de referencia espacial que ocurre durante el envejecimiento está asociada a una multiplicidad de alteraciones estructurales, celulares y moleculares a nivel del hipocampo, muchas de las cuales son comparables a las que ocurren durante el envejecimiento del cerebro humano (**Morel et al., 2015**). En consecuencia, la rata senil constituye un modelo animal adecuado para evaluar estrategias terapéuticas de potencial valor clínico en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas seniles. En el caso de este trabajo de tesis, el modelo animal utilizado es la rata hembra Sprague-Dawley. Esto se debe a que en el laboratorio se viene caracterizando esta cepa desde hace más de 20 años como modelo de envejecimiento cerebral espontáneo. En el año 2003 se caracterizó el eje hipotálamo-hipofisario (**Sanchez et al., 2003**). Se continuó la caracterización en la región mesencefálica, específicamente en *substantia nigra* (**Sanchez et al., 2008**). Más recientemente, y más relacionado a este trabajo, se caracterizó el hipocampo (**Morel et al., 2015**). Otro motivo principal en la elección de este modelo es que en bibliografía existen más publicaciones realizadas en machos, y se ha visto en estudios de otros grupos de nuestro Instituto que existen diferencias en los efectos de ciertos tratamientos aplicados a los distintos sexos. Por último, si bien actualmente las normas del cuidado y uso de animales de laboratorio proponen la utilización de machos y hembras como una sola cohorte, nuestros experimentos requieren criar los animales hasta la mediana edad (12-18 meses) y la vejez (24-32 meses), de modo que trabajar con hembras ofrece una ventaja en cuanto al espacio ocupado en el bioterio y los gastos de mantenimiento.

1.1.3 Teorías de envejecimiento

Daño oxidativo

Esta teoría ha sido la más ampliamente aceptada en las últimas décadas. La misma propone que el envejecimiento es la consecuencia de la acumulación progresiva del daño oxidativo al ADN (**Ames, 1989; Campisi y Vijg, 2009**), lo cual se piensa como un factor especialmente relevante dentro de la mitocondria, donde la respiración está asociada a la generación continua de especies reactivas de oxígeno como subproductos de la reducción del O₂ (**Van Remmen y Richardson, 2001**). De acuerdo con este modelo, el envejecimiento es un proceso irreversible que sólo se puede enlentecer mediante intervenciones tales como la restricción calórica (**Sohal y Weindruch, 1996**).

Daño acumulativo del ADN

El daño del ADN se produce continuamente en las células de los organismos vivos. Aunque la mayoría de estos daños se reparan, algunos se acumulan, ya que las ADN polimerasas y otros mecanismos de reparación no pueden corregir los defectos tan rápido como parecen producirse. Las mutaciones genéticas se producen y se acumulan con la edad, causando que las células se deterioren y funcionen mal. En particular, el daño al ADN mitocondrial podría conducir a la disfunción mitocondrial. Por lo tanto, el envejecimiento resulta del daño a la integridad genética de las células del cuerpo (**Jin, 2010**).

Acortamiento de telómeros

Esta teoría propone que existe una senescencia replicativa que deriva en el incremento del número de células que entran en estado post-mitótico provocando una pérdida en las funciones fisiológicas que está relacionada a la edad (**Campisi, 1997; Hayflick, 1985; Timiras, 1994**). Actualmente está aceptado que la senescencia replicativa ocurre en células donde los telómeros, que son los extremos físicos de los cromosomas, se han acortado. Como la maquinaria de replicación del ADN no es capaz de replicar completamente los extremos de los cromosomas lineales (**Olovnikov, 1973**), los telómeros se acortan con cada ronda de síntesis del ADN. La telomerasa es la enzima que ayuda a mantener la longitud del telómero y por lo tanto la integridad de los cromosomas. La actividad de esta enzima parece estar ausente o disminuida a niveles muy bajos en muchos tejidos somáticos adultos (**Broccoli et al., 1995; Chiu et al., 1995; Kim et al., 1994**), de modo que la longitud de los telómeros se reduce gradualmente, incluso en ausencia de daño oxidativo, aunque también se ha sugerido que dicho daño puede ser el factor más importante que conduce al acortamiento de los telómeros (**von Zglinicki, 2000**).

Pérdida de proteostasis

La fidelidad del proteoma se mantiene mediante la homeostasis proteínica (proteostasis). Esto se logra gracias a un sistema multi-compartimental que coordina la síntesis proteica, el plegamiento, la desagregación y la degradación (**Powers et al., 2009**). Si la actividad de este sistema se altera, se producen cambios en la capacidad de las células para amortiguar la acumulación de proteínas mal plegadas y dañadas, llevando a la aparición de agregados proteicos no nativos en diversos tejidos (**Labbadia et al., 2015**).

Teoría epigenética

Esta teoría propone que el epigenoma es el principal factor involucrado en el envejecimiento. Esto se basa en la evidencia de que es posible llevar a cabo una reprogramación de células somáticas provenientes de individuos envejecidos obteniendo como resultado un estado desdiferenciado de dichas células, lo cual implica que el proceso de envejecimiento es reversible (**Rando y Chang, 2012**). Estudios en organismos modelo tales como levaduras (**Sen et al., 2015; Hachinohe et al., 2011**), moscas (**Wood et al., 2016**) y gusanos (**Greer et al., 2010**) han demostrado que el envejecimiento está asociado a cambios progresivos en la regulación de la cromatina.

1.2 Epigenética

La epigenética es el conjunto de toda la información no genómica que está almacenada en las células. Esta información es la que permite, a partir de un mismo set de instrucciones, el desarrollo y diferenciación de cientos de tipos celulares diferentes. Esto se traduce en que cada tipo celular puede expresar un subconjunto restringido de genes que lo define (mientras que el genoma de los mamíferos tiene alrededor de 25000 genes, unos pocos miles de genes se expresan en cada tipo de célula). Este set de genes que se expresa en cada célula es regulado por la combinación de dos factores: la actividad de factores de transcripción (FT) específicos para cada linaje y las marcas epigenéticas dentro del genoma. Estas marcas o modificaciones cumplen en el genoma la misma función que las marcas de puntuación en el lenguaje. A diferencia del lenguaje, el genoma tiene sólo 4 letras: A, C, G y T, las 4 bases. Sin embargo, hay miles de millones de pares de bases que se unen formando secuencias específicas. Las marcas epigenéticas son las que permiten interpretar la información escrita con esas 4 bases, delimitando el inicio y fin de los genes, dándole estructura a los cromosomas y alterando la manera de “leer” cada gen. Existen marcas epigenéticas asociadas tanto al silenciamiento como a la activación de genes. La marca epigenética más estudiada (y en la que nos centraremos en esta tesis) es la metilación del ADN.

1.2.1 Metilación del ADN

Esta modificación epigenética regula el estado de la cromatina (marca represiva) y consiste en la adición de un grupo metilo a una citosina. En mamíferos, la metilación ocurre casi exclusivamente en citosinas seguidas de guaninas, es decir dinucleótidos CpG (**Fig. 1.1**). Estos dinucleótidos están agrupados en lo que conocemos como islas CpGs, generalmente en promotores de genes. La metilación del ADN es mitóticamente heredable. El hecho de que ocurra casi exclusivamente en dinucleótidos CpG se debe a que estos dinucleótidos son simétricos respecto a la otra hebra de ADN, lo cual facilita el mantenimiento de esta marca a través de la división celular. El proceso de metilación del ADN es llevado a cabo por metiltransferasas. En mamíferos, las DNMT3A y DNMT3B se encargan de la metilación *de novo* (es decir que usan como sustrato ADN no metilado). Cuando el ADN se replica, el resultado son dos ADN doble cadena semi-metilados (cada ADN hijo tiene una hebra original, que mantiene la marca, y una cadena sintetizada sin metilar). Este ADN semi-metilado sirve como sustrato para otra metiltransferasa, la DNMT1, que se encarga de mantener la metilación como una marca epigenética estable. En cuanto a la eliminación de la metilación, puede ser pasiva o activa. En el último caso, se lleva a cabo mediante proteínas TET. Estas proteínas sólo se expresan en células germinales primarias y en células madre embrionarias. Por tal motivo, el mecanismo predominante es el de metilación (DNMT1), mientras que las proteínas TET se encuentran muy raramente. Esto permite que la metilación sea estable.

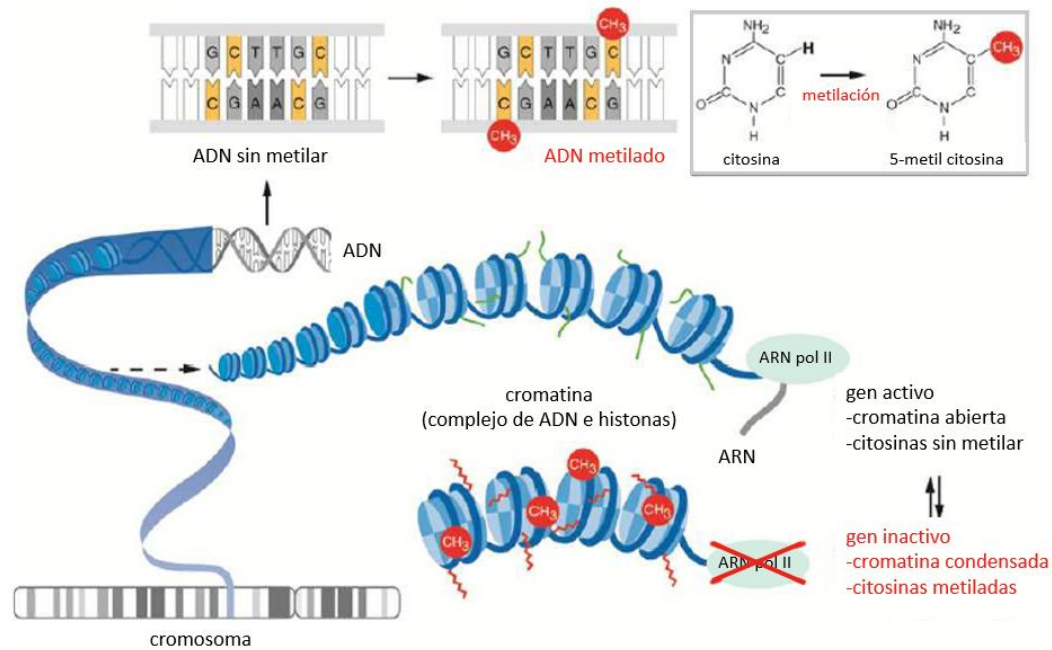


Figura 1.1. Metilación del ADN. La adición del grupo metilo (CH_3) a los residuos de citosina forma 5-metilcitosinas, que se unen a la guanina de la misma forma que las citosinas normales, pero tienen una interacción distinta con las proteínas que controlan la expresión génica. Figura adaptada de Mukherjee *et al.*, 2015.

Hemos mencionado que la metilación ocurre casi exclusivamente en islas CpG, en promotores de genes. Las otras regiones del genoma en donde se puede hallar metilación son las regiones intergénicas y los elementos repetitivos. Durante la juventud, las regiones intergénicas y los elementos repetitivos suelen estar metilados. Esto es sinónimo de que están inactivos. Las islas CpG, por el contrario, suelen estar protegidas de la metilación, para que estén activas. Este patrón de metilación, esencial para mantener la estabilidad del genoma, cambia con el envejecimiento (**Fig. 1.2**). Esta regulación que ejerce la metilación del ADN es indispensable para la viabilidad de un organismo. Se han generado ratones knock-out para la DNMT1 – encargada de mantener la metilación cuando hay replicación del ADN – y se ha observado que los mismos mueren en el útero alrededor de la mitad de la gestación (**Brown y Robertson, 2007**).

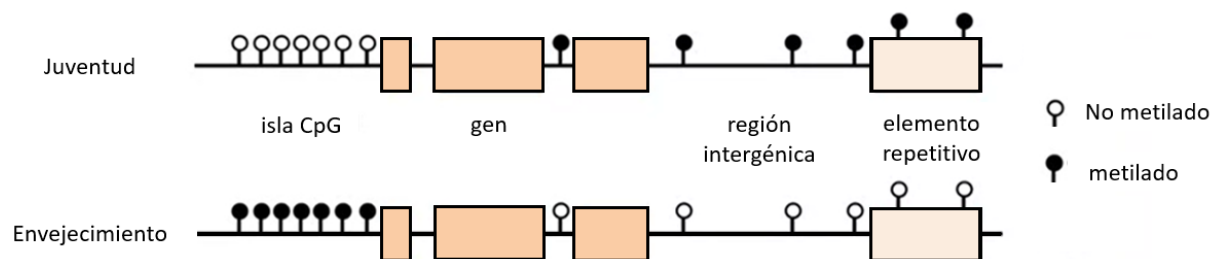


Figura 1.2. Patrón de metilación dependiente de la edad.

1.2.2 Teoría del reloj epigenético

El nivel de metilación relacionada a la edad de un conjunto de dinucleótidos citosina-guanina en determinadas posiciones del genoma constituye un biomarcador de edad bastante exacto. Este biomarcador fue desarrollado por Stephen Horvath (**Horvath, 2013**) y se conoce como reloj epigenético. Para desarrollar este predictor de edad, Horvath tomó datos de metilación de casi 8000 muestras provenientes de distintos tejidos humanos para desarrollar un algoritmo matemático que utiliza el estado de metilación dependiente de la edad (valor beta) de 353 CpGs y a partir de ese perfil de metilación genera un número que se expresa en años y representa la edad epigenética o biológica. El valor beta es 0 para una CpG no metilada, y 1 para una CpG metilada. Es decir, si el valor beta es 0,25 para una CpG particular quiere decir que el 25 % de todas las copias de esa CpG están metiladas, lo cual se traduce en que las células de un mismo tipo, de cierta población o tejido, son epigenéticamente heterogéneas. La edad epigenética es en realidad una medida de dicha heterogeneidad, que es un marcador de envejecimiento. En humanos, la edad epigenética generada por este predictor muestra una correlación de 0,96 con la edad cronológica y un margen de error de 3,6 años (**Raj, 2018**). Esta es una precisión muy superior a todos los biomarcadores de edad documentados hasta el momento, que lógicamente se logra en un contexto de envejecimiento normal; en circunstancias patológicas (por ejemplo, Alzheimer, Huntington y Parkinson), la edad epigenética mostrada por el reloj representa una edad biológica más alta que la cronológica (**Horvath y Ritz, 2015**). Esta diferencia entre la edad epigenética y la cronológica es conocida como aceleración de la edad epigenética, y toma un valor positivo cuando la edad epigenética es mayor a la cronológica. Esto tiene que ver con la tasa de cambio en la metilación en el ADN, o “tic-tac” del reloj epigenético. Esta tasa es muy alta en los seres humanos desde el nacimiento hasta el año de vida. Entre 1 y 20 años de vida se desacelera progresivamente y a partir de los 20 años cambia a una tasa mucho más lenta (**Raj, 2018**) (**Fig. 1.3**). Esto sugiere que la esperanza de vida de un individuo no tiene que ver con la cantidad total de “tic-tacs” de su reloj, si no con la tasa con la que funciona luego de los 20 años. Existe evidencia de que la genética es la principal responsable del control de esta tasa: se conoce que la misma es más lenta en individuos supercentenarios y sus descendientes (**Horvath et al., 2015**).

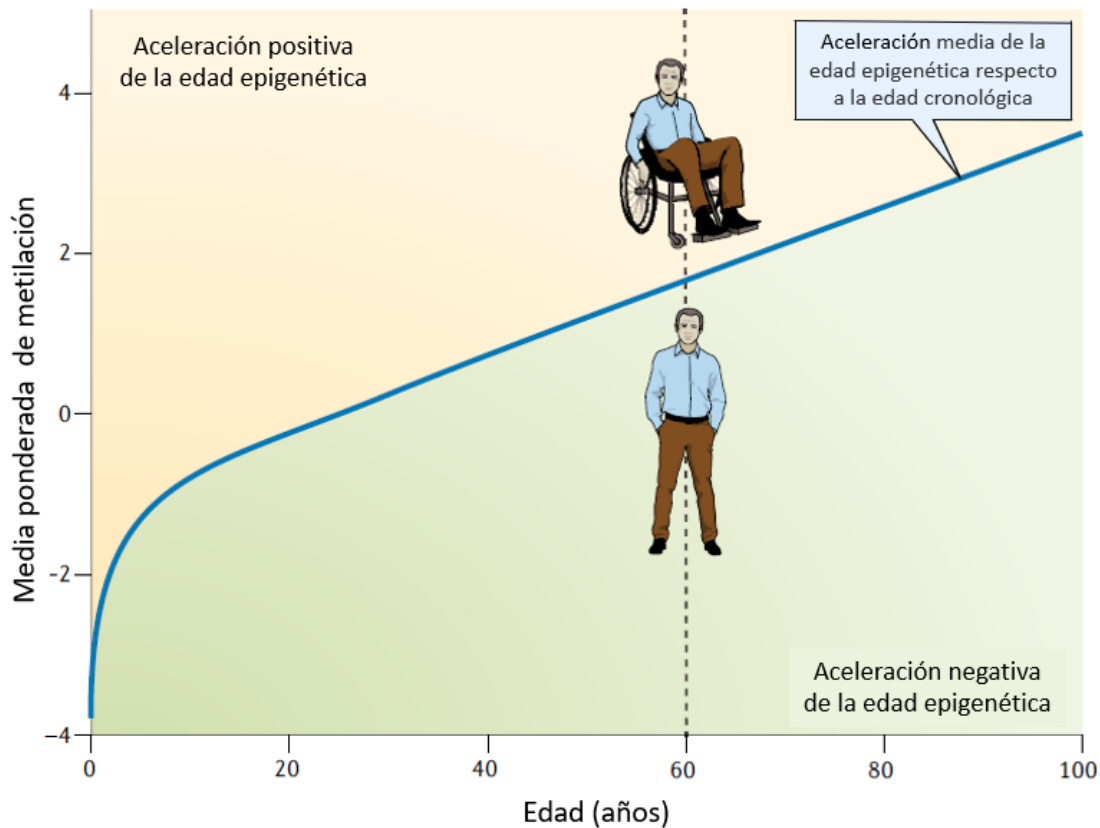


Figura 1.3. Aceleración de la edad epigenética respecto a la edad cronológica. Imagen adaptada de Raj, 2018.

Esta teoría apoya la teoría epigenética de envejecimiento, planteando que el mismo es en realidad una consecuencia involuntaria del programa de especialización de las células y que la activación y represión de sets de genes específicos que permiten dicha especialización es necesaria – biológicamente hablando – sólo hasta que el organismo alcanza la madurez.

Además, esta teoría permite explicar procesos que no pueden entenderse mediante las teorías convencionales, tales como la génesis de un organismo completamente joven que no hereda rasgos envejecidos de sus progenitores. Según la teoría del daño acumulativo, las células germinales de los mismos deberían portar un cierto nivel de daño acumulado en su ADN, de modo que el nuevo cigoto heredaría ese daño, aunque fuese mínimo. Así, el daño se acumularía generación tras generación, llevando a un debilitamiento de la especie y a su eventual extinción. La teoría epigenética permite explicar que el cigoto tenga su reloj epigenético reiniciado gracias a los factores de reprogramación presentes en el citoplasma de la célula. Esta hipótesis se basa en la evidencia de que al reprogramar células murinas o humanas a células pluripotentes, su edad epigenética es reiniciada a cero (**Horvath, 2013; Petkovich et al., 2017**). Y esto mismo ocurre naturalmente al momento de la fertilización: se eliminan las marcas de metilación en el ADN paterno (derivado del esperma) y, durante las divisiones mitóticas, se pierden marcas más generales de metilación en el cigoto y el embrión, preservando la impronta específica de los padres. En la etapa de blastocisto, la metilación *de novo* del ADN distingue las células de la masa celular interna (ICM) – a partir de las cuales surgen linajes embrionarios para crear estructuras fetales – de las células trofoectodérmicas,

relativamente hipometiladas – a partir de las cuales surgen linajes extraembrionarios para crear estructuras transitorias, incluida la placenta – (**Fig. 1.4**). La especificación del linaje de las células germinales comienza en las células del epiblasto proximal, e implica un segundo borrado extensivo de la metilación del ADN que elimina la impronta de los padres (**Fig. 1.4**) (**Cortessis et al., 2012**). A partir de entonces, se establecen nuevas marcas de metilación de ADN en muchas etapas, extendiéndose a través de la madurez sexual de acuerdo con el sexo del individuo en desarrollo. En este momento, se establecen las marcas de impronta específicas de sexo que rigen la expresión específica de los genes impresos en la generación siguiente (**Faulk y Dolinoy, 2011**). El reinicio de la información epigenética en cada generación permite la supervivencia de la especie de manera prolongada en el tiempo.

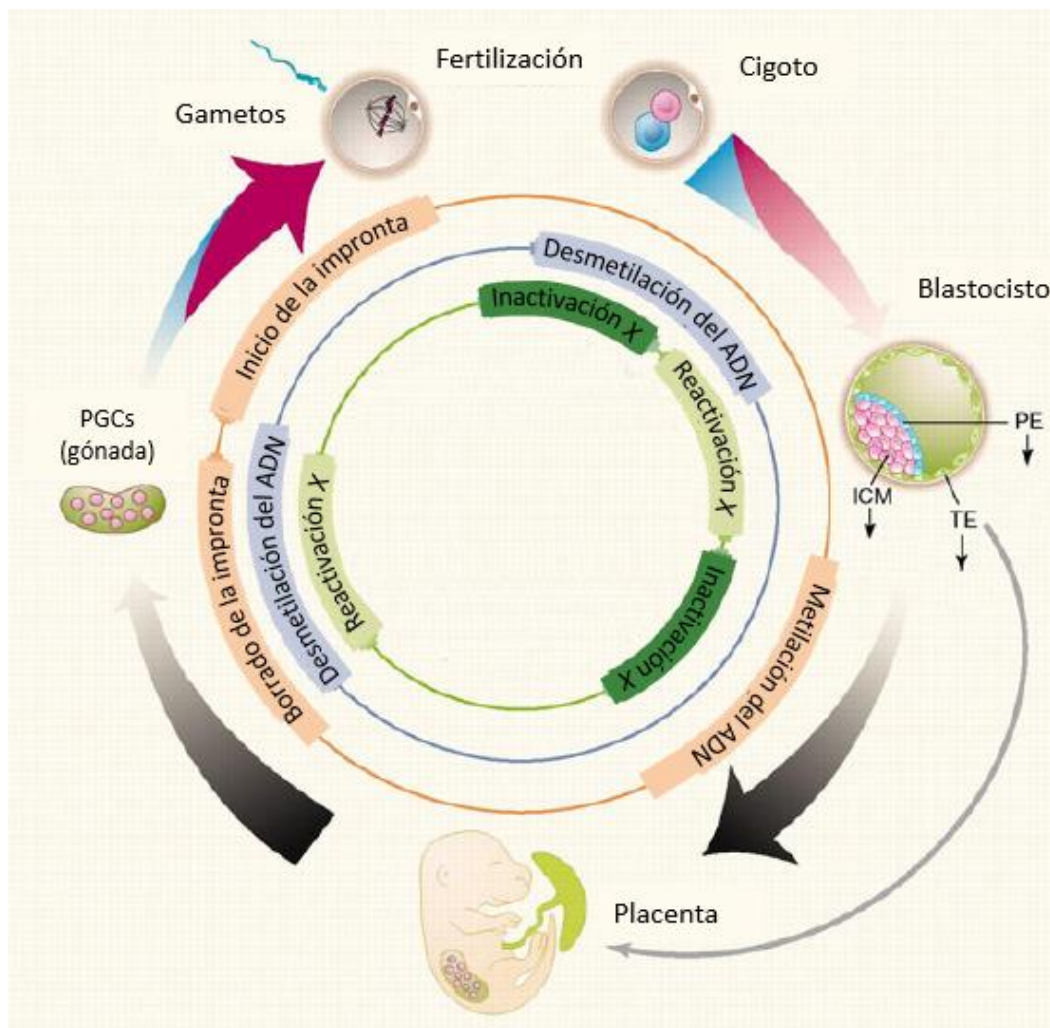


Figura 1.4. Reprogramación de la metilación del ADN en el cigoto, embrión temprano y células germinales primordiales. El grosor de las flechas exteriores indica los niveles de metilación del ADN. Se señala el genoma materno en rojo, el genoma paterno en azul y el genoma diploide en negro. Los círculos internos indican las etapas de desarrollo en las que ocurren eventos clave de la programación epigenética. Imagen adaptada de Cortessis et al., 2012.

1.3 Reprogramación celular

Tradicionalmente, la idea de “diferenciación celular” hacía referencia a la transformación de una célula no comprometida hacia una célula específica de un tejido. Sin embargo, este punto de vista cambió al demostrarse que es posible alterar el destino de células completamente diferenciadas hacia células pluripotentes o hacia otro tipo celular completamente diferenciado. Las células somáticas se pueden reprogramar a células pluripotentes usando varios métodos que incluyen, entre otros, transferencia nuclear a células somáticas (**French et al., 2008**), fusión celular y reprogramación inducida por el medio de cultivo. El descubrimiento de la pluripotencia inducida representa la síntesis de principios científicos y tecnologías que se han desarrollado durante las últimas seis décadas. Entre los esfuerzos que abrieron camino hacia la reprogramación celular podemos mencionar el trabajo de John Gurdon y colaboradores en los años sesenta, cuyos estudios demostraron que el núcleo de una célula diferenciada de rana adulta podía ser reprogramado, cuando se transfería a un óvulo enucleado, a una célula totipotente a partir de la cual se podía generar una rana adulta (**Gurdon, 2006**). Este hallazgo inició un camino que llevó a la clonación de mamíferos por transferencia nuclear somática, alcanzada en 1996 con el nacimiento de la oveja Dolly (**Wilmut et al., 1997**), un logro que fue seguido por trabajos que documentaron la clonación de otras especies. Quedó demostrado entonces que en el citoplasma de un ovocito maduro hay moléculas capaces de reprogramar un núcleo somático, poniendo en marcha el programa de desarrollo de un nuevo individuo. El éxito de la clonación animal permitió a su vez visualizar que el destino celular no es fijo, y que distintos programas de expresión génica pueden ser activados en células terminalmente diferenciadas por medio de factores definidos. Ya en la década de los ochenta se había descubierto que un único FT, MyoD, resultaba capaz de convertir fibroblastos en células de músculo esquelético, es decir que era posible cambiar el destino celular a través de la sobreexpresión de FT específicos (**Davis et al., 1987**).

En el año 2006, Takahashi y Yamanaka lograron demostrar que la transferencia de tan sólo cuatro genes de pluripotencia – *oct4*, *sox2*, *klf4* y *c-myc* (OSKM) – a fibroblastos murinos (células adultas totalmente diferenciadas) era suficiente para reprogramarlos, llevándolos a un estadio en el que se comportan como células madre embrionarias (ESCs, del inglés *embryonic stem cells*) (**Takahashi y Yamanaka, 2006**). Las células en este estadio se denominaron células madre pluripotentes inducidas (iPSCs, del inglés *induced pluripotent stem cells*). Un año después, demostraron que estos mismos genes, conocidos como genes de Yamanaka, eran capaces de reprogramar células somáticas humanas a iPSCs (**Takahashi et al., 2007**) (**Fig. 1.5A**).

También existen formas de reprogramación que no involucran la génesis de iPSCs. La transdiferenciación o reprogramación de linaje consiste en la conversión directa de un tipo celular adulto en otro por expresión ectópica de múltiples FT específicos de linaje o micro-ARN (**Fig. 1.5B**) (**Ieda, 2013; Sancho-Martinez et al., 2012**). Se ha logrado producir un amplio rango de tipos celulares mediante esta metodología (**Ieda et al., 2010; Kim et al., 2011; Vierbuchen et al., 2010**). Sin embargo, las células generadas con este procedimiento pueden demostrar una capacidad proliferativa restrictiva, limitada diversidad de tipo celular e incluso temprana senescencia, lo cual compromete sustancialmente su potencial aplicación clínica en terapia regenerativa (**Margariti et al., 2012**). En 2011 se desarrolló una nueva estrategia

denominada reprogramación directa mediada por factores de pluripotencia (RDP) (Kim *et al.*, 2011). Este procedimiento utiliza células somáticas totalmente diferenciadas y las convierte en otros tipos de células somáticas a partir de la expresión transitoria de genes de pluripotencia (es decir, se hace una reprogramación parcial), usualmente durante 3-5 días, generando intermediarios epigenéticamente inestables (EI) que responden a cócteles apropiados de factores de diferenciación específicos (Fig. 1.5C). Es importante mencionar que estos intermediarios EI conservan la identidad de sus células de origen. La estrategia RDP se originó a partir de observaciones iniciales que indicaban que las iPSCs se generan de una manera secuencial y estocástica. Esto llevó a la hipótesis de que podría ser posible manipular las células en un estado temprano altamente inestable en términos epigenéticos, inducido por los factores de Yamanaka. En presencia de factores de diferenciación apropiados, estos intermediarios EI pueden ser inducidos posteriormente a su diferenciación en diversos linajes de células somáticas con perfiles epigenéticos más estables. Aunque la hipótesis inicial fue que en la RDP los intermediarios EI no pasan por un estadio de pluripotencia, estudios posteriores mostraron que cuando se utiliza RDP para generar cardiomiocitos reprogramados o células madres neurales (NSCs, del inglés *neural stem cells*), la mayoría de las células inducidas derivadas de fibroblastos de ratón por reprogramación inducida con los cuatro genes de Yamanaka (OSKM) pasan a través de un estado transitorio de pluripotencia, como lo demuestra la reactivación del cromosoma X y la expresión de NANOG y OCT4 endógenos (Maza *et al.*, 2015; Bar-Nur *et al.*, 2015). En vista de estas pruebas, ahora los términos intermediarios EI e intermediarios pluripotentes se consideran equivalentes. El hecho de que la RDP implique una etapa transitoria de pluripotencia hace concebible que la RDP aplicada a células somáticas de donantes viejos pueda borrar al menos parte de las marcas epigenéticas del envejecimiento.

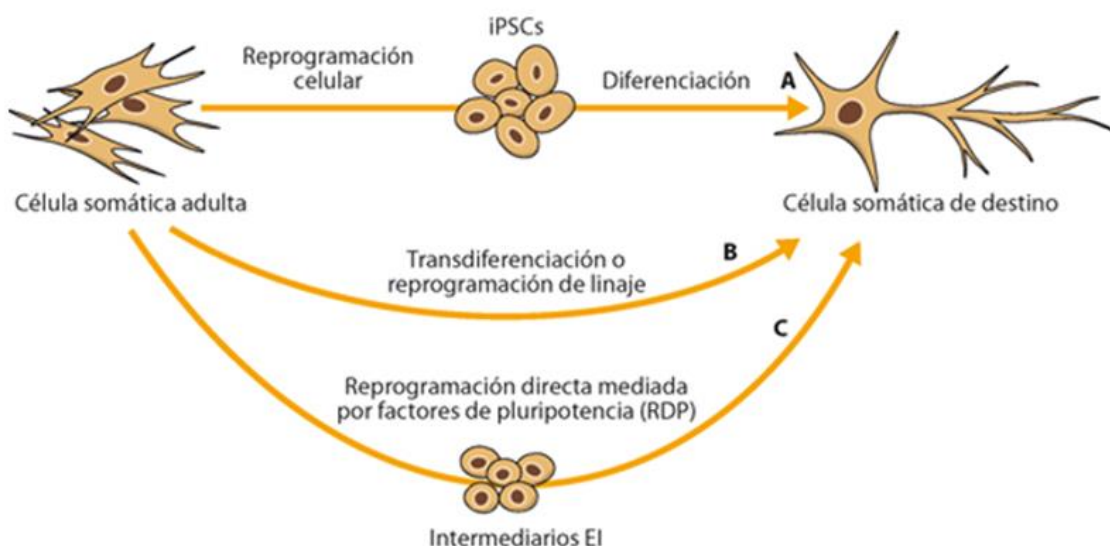


Figura 1.5. Esquema que ilustra los distintos métodos de reprogramación celular. **A)** Método original de Yamanaka *et al.* (2016). **B)** Reprogramación de linaje. **C)** Reprogramación directa mediada por factores de pluripotencia (RDP).

También en el año 2011, se dio a conocer un trabajo del grupo de Lemaitre en el cual se tomaron fibroblastos de individuos centenarios sanos, que presentaban anomalías morfológicas y metabólicas asociadas al envejecimiento tales como telómeros acortados, altos niveles de ROS y una capacidad proliferativa reducida. Estos fibroblastos fueron expuestos a un cóctel de seis genes de pluripotencia, los cuatro genes de Yamanaka más los genes NANOG y LIN28, logrando llevar estas células a iPSCs para luego diferenciar el cultivo a fibroblastos nuevamente. Estos fibroblastos obtenidos presentaban una capacidad proliferativa restaurada y parámetros indistinguibles de los de una célula joven, de modo que se había logrado un rejuvenecimiento *in vitro* (Lapasset *et al.*, 2011). En línea con estos resultados surge la idea de realizar experimentos *in vivo*, lo cual trae aparejado el problema de que la expresión continua de los genes OSKM podría generar una desdiferenciación masiva a nivel celular y tisular favoreciendo la formación de teratomas y un aumento en la mortalidad de los animales. Para evitar esta enorme desventaja de la técnica, Belmonte y colaboradores diseñaron otra forma de reprogramación denominada reprogramación parcial cíclica, en la cual, tal como indica su nombre, se implementan ciclos de reprogramación, que consisten en días de expresión génica intercalados con días de silenciamiento de los genes de manera tal que se interrumpe el proceso de reprogramación – es decir se hace una reprogramación parcial o incompleta – para evitar alcanzar el estadio de iPSCs sin interferir con el proceso de rejuvenecimiento progresivo de las células y tejidos de los animales. En el trabajo de Belmonte se emplearon ratones progélicos (con un envejecimiento acelerado) que expresan los genes de Yamanaka bajo el control de un promotor regulable por doxiciclina (DOX). En condiciones basales los genes están silentes, y al agregar DOX al agua de bebida, se activa su expresión. Al eliminarse la DOX, los genes vuelven a silenciarse. Así se siguió un diseño experimental de ciclos de 2 días de expresión y 5 días de silenciamiento. Luego de varios ciclos se estudiaron algunos órganos de los ratones tratados y muchos signos del envejecimiento típico se vieron atenuados o revertidos, y si bien no se logró rejuvenecer a los animales y eventualmente murieron, los animales tratados vivieron un 50 % más que los controles progélicos (cabe destacar que los ratones progélicos a los 2 meses de edad ya son seniles y viven aproximadamente 4 meses) (Ocampo *et al.*, 2016). Estos resultados apoyan la hipótesis de que las marcas epigenéticas del envejecimiento pueden ser reiniciadas. Estos experimentos fueron de enorme interés, sin embargo, muy difíciles de reproducir en ratones no progélicos. En el año 2020, se publicó un trabajo del grupo de Sinclair en el cual se utilizaron vectores virales como alternativa de terapia génica, de especial interés para nuestro grupo puesto que este tipo de vector forma parte de nuestras herramientas en el laboratorio. En este trabajo, se utilizó un modelo de lesión por aplastamiento del nervio óptico de ratones normales. Para tal fin, se “pellizcó” el nervio óptico de los ratones sin llegar a cortarlo, para causar degeneración axonal y pérdida de visión en el ojo lesionado. Luego se inyectaron tres de los cuatro genes de Yamanaka (OSK) en el cuerpo vítreo del ojo lesionado, y después de unos días se encontró una regeneración axonal y una recuperación de la visión en los ratones. Estos resultados son de gran importancia al momento de comprender el alcance de la terapia con vectores virales, ya que además se observó que al expresar continuamente los genes OSK en estas neuronas por 15 meses no se produjeron efectos adversos, sólo efectos regenerativos. Tanto el trabajo de Belmonte en 2016 como el de Sinclair en 2020 se basaron en la hipótesis

de que el envejecimiento es en gran parte consecuencia de cambios epigenéticos que se pueden revertir.

1.4 Terapia génica

La transferencia de genes tiene numerosas aplicaciones en las ciencias básicas y en la clínica. Típicamente, la transferencia de genes se refiere al uso de ácidos nucleicos para incrementar, disminuir o suprimir la expresión de una proteína de interés (**De Laporte et al., 2006**). La aplicación más ambiciosa de la transferencia de genes es la terapia clínica. Precisamente, distintas moléculas codificadas por ácidos nucleicos pueden ser usadas para atenuar enfermedades en diferentes etapas, así como para prevenir la progresión de las enfermedades y sus complicaciones (**Patil et al., 2005**).

En general, se define a la terapia génica como la transferencia de material genético con fines terapéuticos. Alternativamente se la puede definir como el tratamiento de enfermedades, hereditarias o adquiridas, mediante la transferencia *in vivo* de polinucleótidos que alteran la expresión de proteínas específicas resultando en un beneficio terapéutico (**Dubé y Cournoyer, 1995; Basarkar y Singh, 2007**). Este objetivo puede lograrse, básicamente, mediante la producción de una proteína o ARN mensajero, por reemplazo o suplementación del producto de un gen que está ausente o defectuoso (**Dubé y Cournoyer, 1995**). Asimismo, el beneficio terapéutico puede lograrse mediante la supresión de genes, ARN mensajero o por la interacción con proteínas (aptámeros) resultando en el bloqueo selectivo de la expresión o de la actividad de una proteína implicada en la enfermedad (**Patil et al., 2005**).

Una limitación de la terapia génica como estrategia terapéutica es que la captación celular de moléculas de ADN desnudo es un proceso ineficiente. Estas moléculas son inestables *in vivo* por ser rápidamente degradadas por exo- y endonucleasas hidrolíticas (**Patil et al., 2005**). Consecuentemente, se han desarrollado numerosas estrategias de transferencia de polinucleótidos, tanto *in vitro* como *in vivo*, para facilitar la inserción de estas moléculas en las células blanco y para protegerlas de la degradación celular. El tipo de molécula terapéutica y el propósito clínico que se persigue, determinan la elección de la estrategia a utilizar.

El mayor desafío de la terapia génica es el desarrollo de métodos que transfieran un gen terapéutico (transgén) a las células seleccionadas y que logren una apropiada expresión del gen. Un método óptimo de transferencia génica debe lograr proteger al transgén de la degradación por las nucleasas en la matriz extracelular, transportar el transgén a través de la membrana plasmática y, si es necesario, introducirlo al núcleo de las células blanco, y no generar efectos perjudiciales (**Gao et al., 2007**).

1.4.1 Vectores como métodos de transferencia

Se han mencionado en la sección 1.3 varios ejemplos de reprogramación utilizando diferentes métodos de transferencia de ácidos nucleicos, entre ellos, los vectores. Estos sistemas se utilizan como vehículos para administrar ácidos nucleicos, ayudando en el proceso de transferencia de un gen exógeno a la célula, facilitando la entrada y la biodisponibilidad intracelular del mismo, de modo tal que el gen exógeno pueda funcionar correctamente. Los vectores generalmente se clasifican en vectores no-virales y vectores virales.

Vectores virales

Los vectores virales provienen de virus que fueron modificados genéticamente con el fin de impedir que se repliquen dentro de las células huésped. A diferencia de los vectores no-virales, estos vectores presentan una elevada eficiencia en la transferencia de ácidos nucleicos. Esta es la principal ventaja de la utilización de virus como vectores de transferencia génica. Sin embargo, también poseen desventajas, tales como la respuesta inmune que desencadenan, la limitación en el tamaño del transgén que pueden transportar, lo dificultoso de su producción a escala industrial y la potencial mutagénesis insercional que pueden producir (lo cual depende del tipo de vector viral utilizado) (Basarkar y Singh, 2007; Patil *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2007). Los principales tipos de vectores virales en uso son los retrovirus, adenovirus (Ad), lentivirus (derivados del VIH), vectores herpéticos y vectores adeno-asociados (AAV).

Los vectores adenovirales derivan de los adenovirus (Ad), pertenecientes a la familia *Adenoviridae*. Entre los más de cincuenta serotipos descritos y clasificados (Davison *et al.*, 2003), el más comúnmente utilizado como vector para la transferencia de genes es el Ad-5 (Lentz *et al.*, 2012). Los Ad pueden infectar células de diversos tejidos, tales como las vías respiratorias, urinarias, los ojos y el hígado. En humanos, los Ad causan infecciones oculares, respiratorias e intestinales y no son oncogénicos (Chen and Lee, 2014).

La partícula adenoviral tiene un tamaño de 70 a 100 nm y se compone de una cápside proteica icosaédrica desnuda formada por tres subunidades: el hexón, el pentón y la fibra. El hexón es la subunidad dominante que constituye las caras de la cápside, mientras que el pentón y la fibra forman las espinas que se extienden en los ángulos de la cápside. El pentón es importante para la interacción de la partícula viral con la célula huésped. La fibra posee un dominio en su extremo, denominado nudo o botón, que posee dos funciones: es responsable, en parte, de la entrada del virus a la célula huésped y es clave para la trimerización de las subunidades que conforman la fibra (Krasnykh *et al.*, 2000; Shayakhmetov *et al.*, 2005). (Fig. 1.6).

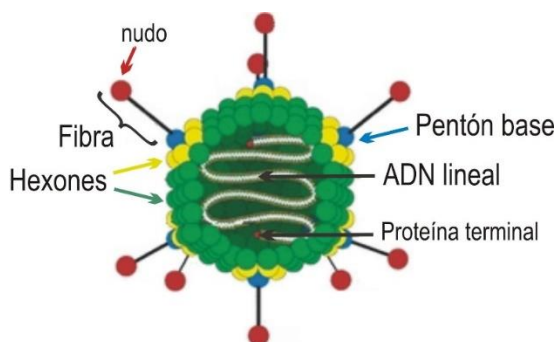


Figura 1.6. Esquema de la estructura del Adenovirus tipo 5.

La infección viral se inicia con el reconocimiento e interacción específica entre proteínas de la cápside viral y receptores de la superficie de la célula blanco. El ingreso del virus a las células blanco mediante este proceso de reconocimiento e interacción altamente selectivo es un paso limitante para que se desarrolle un ciclo de infección exitoso. Los Ad5 se unen a la célula blanco por la interacción del botón terminal de la fibra viral con receptores celulares de superficie de alta afinidad para adenovirus, denominados CAR (Fig. 1.7). Los CAR son un tipo de proteína transmembrana de la superfamilia de las inmunoglobulinas que intervienen en la

endocitosis de la mayor parte de los adenovirus (**Bergelson *et al.* 1997**), siendo las integrinas ($\alpha\beta1$, $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$ y $\alpha3\beta1$) de la célula hospedadora co-receptores que median también el ingreso de los adenovirus a la célula (**Hidaka *et al.* 1999**). Las vesículas con viriones en su interior se incorporan a la vía endosomal y posteriormente se libera el virión al citoplasma. Finalmente, el virión se une específicamente al complejo del poro nuclear y el ADN viral ingresa al núcleo (**Fig.1.7**) (**Campos y Barry 2007**). El genoma adenoviral es un ADN lineal de doble cadena de ~36 kpb flanqueadas por repeticiones terminales invertidas (ITR, *inverted terminal repeats*) (**Davison *et al.*, 2003**). Los ITRs son esenciales para la replicación del genoma viral (**Schaffer *et al.*, 2008**). En el núcleo, el genoma viral permanece en un estado no integrado o episómico y comienzan los procesos de transcripción de los genes virales y de replicación del genoma viral (**Fig. 1.7**). La transcripción de los genes de los adenovirus ocurre en dos etapas consecutivas: una fase *temprana*, durante la cual se expresan los genes tempranos, denominados E (*early*) y una fase *tardía*, durante la cual se expresan los genes tardíos, denominados L (*late*). Los genes E, que comprenden los E1 (A y B), E2 (A y B), E3 y E4 (**Fig. 1.8**), son aquellos que se expresan antes de la replicación del ADN y en su mayoría codifican para proteínas involucradas en la transcripción de los genes virales, la replicación de ADN viral, la supresión de la respuesta inmune y la inhibición de la apoptosis de la célula huésped. Los genes L, que comprenden los L1 a L5 (**Fig. 1.8**), se expresan después de la replicación del ADN y codifican para las proteínas estructurales y para algunas pocas proteínas no-estructurales necesarias para el ensamblaje de la cápside.

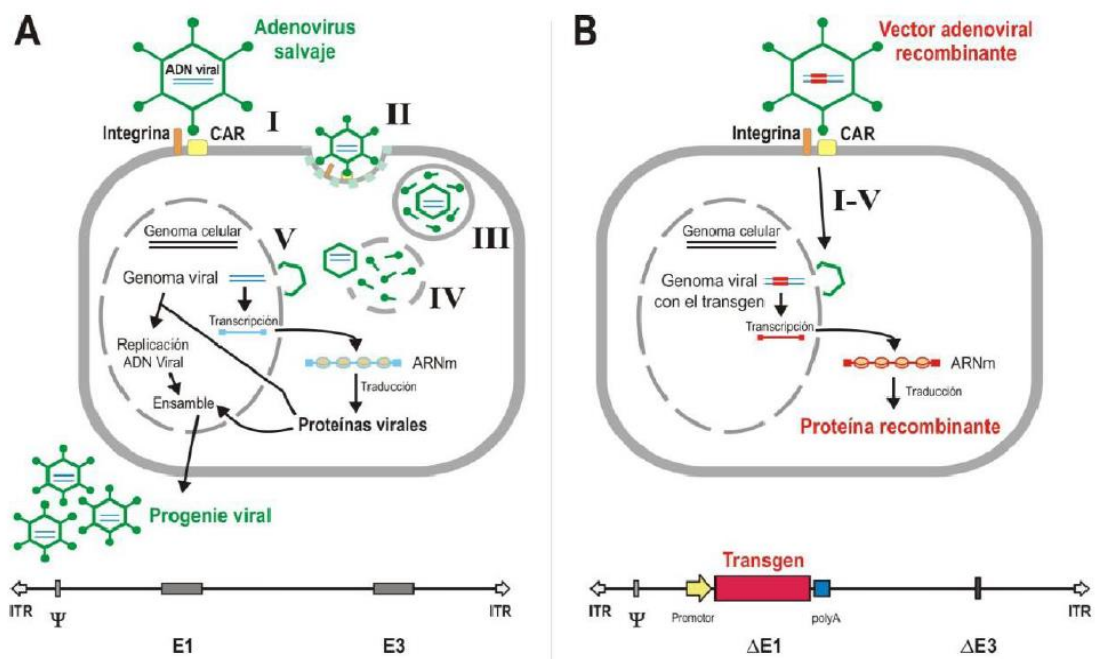


Figura 1.7. Esquemas del ciclo de infección de los adenovirus salvajes y de vectores adenovirales recombinantes. A: Los Ad salvajes se unen a la superficie celular, primero mediante la interacción CAR-fibra viral y luego por la interacción integrina-pentón base (I), que desencadena una cascada de señales y la endocitosis de los viriones en vesículas recubiertas de clatrina (II). El endosoma se acidifica, lo cual causa cambios en la cápside, resultando en la liberación de las fibras, el desensamblaje de los vértices y la exposición de proteínas estructurales (III). Se produce la lisis de la membrana endosomal y el escape de los viriones parcialmente desensamblados (IV). Estos viriones se unen a proteínas del citoesqueleto y llegan a la membrana nuclear donde se unen al complejo del poro nuclear, lo que resulta en el desensamblaje de la cápside y en la liberación del genoma viral dentro del

núcleo de la célula hospedadora (V). En el núcleo, el genoma viral permanece como un episoma, se replica y se traducen sus proteínas, primero las necesarias para la replicación del ADN y luego las estructurales. El ADN viral es empaquetado y la cápside se ensambla en el núcleo, de esta manera se genera la progenie viral, que lisa la célula infectada para esparcirse. En la parte inferior de la figura se observa la representación del genoma del Ad salvaje que consta de las ITRs, la señal de empaquetamiento (Ψ) y todos los genes, incluyendo las regiones E1 y E3. B: Los RAd, replicación defectiva, entran a la célula blanco mediante los mismos pasos que los Ad salvajes (I a V). Sin embargo, una vez que el ADN viral, portador del transgén de interés, se encuentra como un episoma en el núcleo, no se produce la replicación del ADN (debido a que carecen de la región E1), ni se producen nuevas partículas virales. Por lo tanto, el transgén se expresa produciendo grandes concentraciones de la proteína recombinante (típicamente detectable dentro de las 24 hs). En la parte inferior se observa la representación del genoma del RAd que carece de las regiones E1 y E3 ($\Delta E1$ y $\Delta E3$) y contiene el resto de los genes virales, las ITRs, la señal de empaquetamiento ψ , en la región $\Delta E1$, el cassette de expresión del transgén de interés con un promotor y una señal de poliadenilación. Perteneciente a Zappa Villar, 2018.

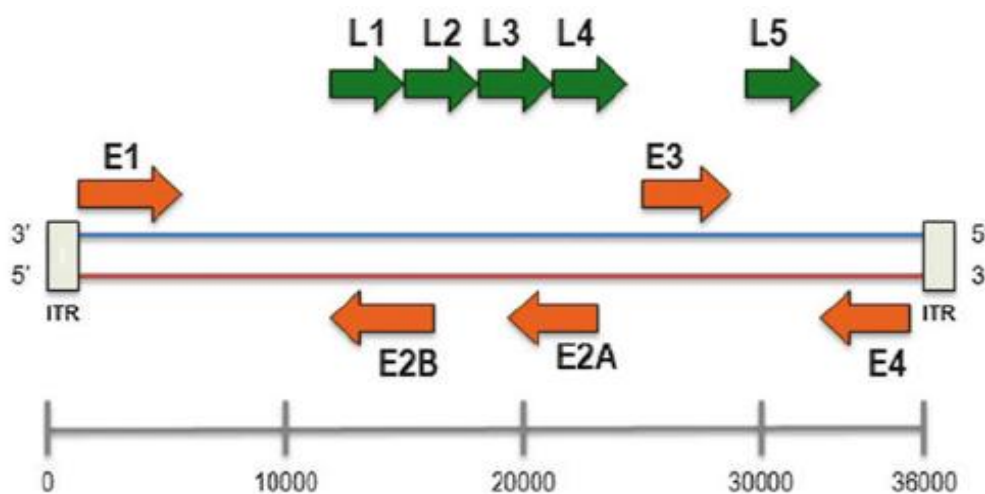


Figura 1.8. Representación esquemática del genoma del adenovirus. Se indica la organización del genoma de un adenovirus típico (Adenovirus 5) incluidas las proteínas tempranas E1-4, las proteínas tardías L1-5 y las repeticiones terminales invertidas (ITR).

Los Ad poseen ciertas características por las cuales son considerados vectores atractivos para la terapia génica. Algunas de estas propiedades consisten en su capacidad de infectar un amplio rango de tipos celulares – incluyendo tanto células en división como post-mitóticas –, la facilidad con la cual se puede manipular su genoma y la capacidad de producirlos con títulos elevados. En este contexto, se generaron vectores adenovirales recombinantes (RAd) como resultado de la inserción del transgén de interés en el genoma adenoviral (**Katayose y Seth, 1999**). Se han desarrollado diversas estrategias para la generación de RAd, las cuales se basan en efectuar modificaciones en el genoma viral en el que subsecuentemente se clona el transgén de interés. La mayor parte de los trabajos con RAd se basó en el uso de adenovirus humanos tipo 2 y 5; esto se debe a que sus genomas se encuentran sumamente bien caracterizados y a que demostraron no inducir tumores en modelos animales (**Katayose y Seth, 1999**). Inicialmente, las regiones de mayor relevancia a manipular para tal propósito fueron la E1 porque codifica para el principal transactivador viral (E1A), la E2 porque codifica proteínas esenciales para la replicación viral y la E3 porque no es esencial para la viabilidad

del vector y permite contar con mayor espacio de clonado (**Yeh y Perricaudet, 1997; Benihoud et al., 1999**). Precisamente, los primeros vectores Ad en construirse fueron los vectores adenovirales recombinantes con ciertos genes deletados, también denominados *vectores adenovirales de primera generación* (**Fig. 1.9**). Estos vectores se basaron en adenovirus a los que se les suprimieron los genes tempranos E1 o E1 y E3, del genoma viral. La eliminación de la región E1 lleva a la incapacidad del virus para replicar y generar progenie (**Yeh y Perricaudet, 1997; Benihoud et al., 1999**) y la supresión de la región E3 genera más espacio dentro del genoma para clonar secuencias exógenas (hasta 7,5 Kbp) (**Katayose y Seth, 1999**). En consecuencia, estos RAds son incapaces de replicarse (replicación defectivos) por lo cual no son infectivos para la célula hospedadora y, de esta manera, se evita la infección generalizada. Estos RAd no replicativos pueden replicarse en líneas celulares específicas, como la línea celular transgénica derivada de riñón de embrión humano 293 (HEK293), que contiene la región genómica E1 faltante del Ad5 y, por lo tanto, expresa los genes necesarios para iniciar la replicación (**Graham y Prevec, 1992**). Dichas células permiten entonces amplificar los RAds, obteniéndose títulos muy elevados que alcanzan las 10^{13} unidades formadoras de placa (pfu)/ml (**Campos y Barry, 2007**).

Para la generación de los primeros vectores adenovirales se suprimieron los genes que se transcriben tempranamente del genoma viral, lo que los volvía incapaces de replicarse evitando así la infección viral generalizada y permitiendo transferir genes de aproximadamente 8 kb. Sin embargo, estos vectores retenían una proporción significativa del genoma viral que permite la expresión residual de genes virales y conduce a la eliminación por el sistema inmune de las células transducidas en tan sólo unas semanas (**Bett et al., 1994**). Las últimas generaciones de vectores adenovirales están completamente desprovistas de secuencias de codificación virales, tienen un mejor perfil inmunogénico permitiendo la expresión más sostenida del transgén en las células transducidas y además poseen una capacidad de clonación de 36 kb, pero requieren de sofisticados sistemas de producción que implican un virus auxiliar capaz de proporcionar en trans todos los elementos necesarios para la encapsidación, lo que puede generar su contaminación con el virus auxiliar (**Alba et al., 2005; Zou et al., 2000**). Por todo esto es que los vectores adenovirales se consideran como una herramienta adecuada para la expresión transitoria de un transgén.

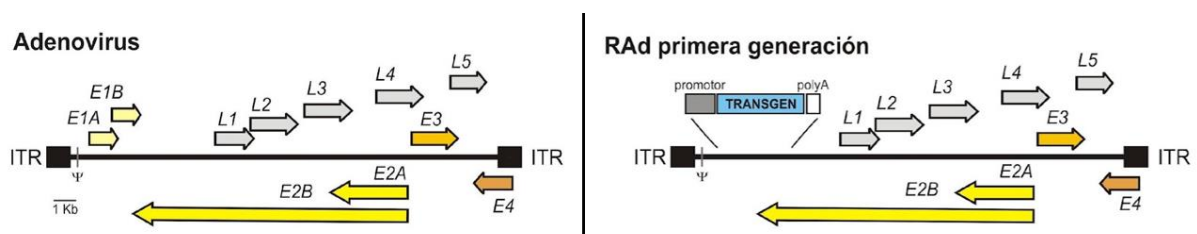


Figura 1.9. Representación esquemática de la organización genética de los adenovirus y Rads de primera generación. ITR, repeticiones invertidas terminales. Ψ , señal de empaquetamiento. Adaptado de Giacca, 2007.

1.5 Memoria y aprendizaje

La memoria es la capacidad de almacenar y recordar la información que se extrae del entorno (**Kandel et al., 2014; Tulving, 2002**). Este es un proceso que consiste en varias fases: codificación (se escribe la información en el cerebro), consolidación (se selecciona la información y se transforma en algo estable a largo plazo), almacenamiento (modificación permanente para retener la información) y recuerdo (reactivación de la información almacenada a partir de señales específicas y precisas para permitir la modificación del comportamiento) (**Dudai et al., 2007; Squire et al., 2015**).

1.5.1 Breve historia del estudio de la memoria

El misterio de cómo funciona este proceso ha despertado interés desde tiempos muy tempranos en la historia del hombre, y su concepto ha ido evolucionando a través de los años. Las nociones fundamentales en cuanto la investigación de cómo la memoria se preserva fueron establecidas por los filósofos griegos Platón y Aristóteles. Platón (427-347 a.C.) fue aparentemente el primero en desarrollar un enfoque coherente de la memoria, discutido en muchos de sus “Diálogos”. Platón creía que el alma inmortal (*psique*) adquiere un conocimiento completo de todas las ideas que componen el mundo. Sin embargo, cuando el alma renace (en otro cuerpo), su conocimiento se encuentra oculto, y a través de la búsqueda y el estudio, lo que ya se conoce puede ser recordado. Por lo tanto, todo conocimiento está latente en la mente (desde el nacimiento) y nunca se olvida. El proceso de recolección (*anamnesis*) provoca conocimiento (no consciente), elevándolo a la conciencia. A su vez, planteaba que no se puede alcanzar el conocimiento sin la percepción. Aristóteles (384-322 a.C.), discípulo de Platón, por su parte creía que el alma (*psique*) es mortal, incluyendo la parte llamada “mente”, y por tanto se nace sin conocimiento previo y se lo adquiere mediante aprendizaje y experiencia (**Engelhardt y Levy, 2023**). Luego apareció el término “traza”, introducido por primera vez por el filósofo romano Cicerón (106-43 a.C.). La “traza de la memoria” es lo que hace factible que la misma se conserve, tenga una conexión con el pasado y pueda recuperarse. Esta traza de memoria sirve como un análogo estructural de los acontecimientos que presenta (**Robins, 2017**). Sin embargo, Cicerón no dio demasiados detalles acerca de este término, sino que fue Descartes, mucho tiempo después (en el año 1641) quien lo definió. Él propuso que la mente se organiza en ideas que son representaciones materiales de lo que es presentado en la misma y lo que resulta de operarla, asociando por primera vez el proceso psíquico a un proceso físico (**Engelhardt y Levy, 2023**). En 1888, Ramón y Cajal postuló que las neuronas forman una estructura contigua más que continua, ya que están conectadas por sinapsis, pero físicamente separadas. Además, en 1894 predijo que la fuerza sináptica es lo que subyace el almacenamiento de la información. En el año 1904, Richard Semon propuso el concepto de “engrama”, que hace referencia a un grupo de neuronas que están activas durante el aprendizaje y que atraviesan procesos bioquímicos y físicos para almacenar la información de manera estable, y que luego son reactivadas durante la fase de recuerdo. Hablaremos del engrama más adelante en esta sección. Semon también fue quien introdujo los términos “codificar” y “recordar”. En 1938, Rafael Lorente de Nó propuso que las neuronas forman “múltiples cadenas de transmisión a través de las cuales circulan los impulsos” y en 1949 Donald Hebb describió que la memoria yace en el refuerzo de las conexiones entre neuronas que han sido activadas en simultáneo. En 1965, Kandel y Tauc

demonstraron que los cambios en las sinapsis son fundamentales para el aprendizaje asociativo y luego, en 1973, Bliss y Lomo describieron una modificación duradera en la fuerza sináptica inducida por un estímulo eléctrico: LTP (del inglés *long-term potentiation*) (**Ortega-de San Luis y Ryan, 2022**).

1.5.2 ¿Dónde ocurre el proceso?

El aprendizaje es un proceso continuo, de modo que los mecanismos que permiten que ocurra deben estar constantemente activos y listos para funcionar. Las fases del proceso de memoria anteriormente mencionadas constituyen un proceso altamente complejo, que todavía no es totalmente comprendido. A su vez, la información se almacena en el cerebro a largo plazo pero de manera susceptible a modificaciones (**Dudai y Eisenberg, 2004**), de modo que debe haber un equilibrio entre esa plasticidad y la fidelidad de los recuerdos (**Raman y O'Leary, 2021**). Particularmente en cuanto al almacenamiento, no está claro si el proceso ocurre a nivel celular o a nivel entorno. A nivel celular, se han propuesto el ADN, ARN, modificaciones epigenéticas, péptidos o modificaciones de proteínas (**Gallistel, 2017; Gold y Glanzman, 2021; Gershman et al., 2021; Hydén, 1967**) como sustratos para la codificación de la información. A nivel entorno, se propone que las redes perineuronales (*perineuronal nets*, PNNs) juegan un rol en el almacenamiento de la memoria. Estas redes son estructuras de la matriz extracelular (ECM, del inglés *extracellular matrix*) que rodean el soma y las neuritas próximas de neuronas maduras y glía en el cerebro, dejando espacios donde se dan las sinapsis (**Frischknecht y Gundelfinger, 2012; Wang y Fawcett, 2012**). La formación y composición de PNNs son dinámicas y responden a la actividad neuronal tanto durante el desarrollo (**Wang y Fawcett, 2012**) como durante la adultez (**Sale et al., 2007**). Se han propuesto las PNNs como un mecanismo de almacenamiento confiable de la memoria puesto que restringen la plasticidad y estabilizan los recuerdos al mismo tiempo que los protegen de ser borrados (**Tsien, 2013**), y que además son formadas por componentes con una tasa de recambio muy baja y de larga vida (**Toyama y Hetzer, 2013**). La estructura formada por las PNNs al momento del aprendizaje sería luego mantenida y protegida por largos períodos para estabilizar las conexiones sinápticas que codifican un recuerdo en particular.

Existen varias regiones del cerebro que están directamente relacionadas con la memoria. El sistema de memoria del lóbulo temporal medial está formado por el hipocampo (giro dentado, hipocampo propiamente dicho y complejo subicular) y las cortezas entorrinal, perirrinal y parahipocampal (postrinal en el caso de la rata) (**Squire y Zola-Morgan, 1991**). Se considera que este sistema está involucrado en todas las formas de memoria declarativa (**Zola-Morgan et al., 1994, Squire y Zola-Morgan, 1996**), que es aquella memoria que implica los recuerdos explícitos, hechos y datos. Esta memoria abarca la memoria semántica (conceptos) y la memoria episódica (vivencias). El hipocampo, más específicamente la zona subgranular (SGZ) del giro dentado, es una de las dos regiones donde se da la neurogénesis adulta (**Aimone et al., 2010**). Las neuronas nacidas en la SGZ se diferencian, maduran tanto morfológica como fisiológicamente, y eventualmente pasan a integrar la red neuronal local como células granulares. Este proceso está íntimamente ligado al aprendizaje y la memoria. En la figura 1.10 se muestra el circuito neuronal del hipocampo, conocido como circuito trisináptico. Se ha determinado que el hipocampo es una estructura crucial para la formación de la memoria episódica y la memoria espacial (**Squire, 1992**). En humanos y animales de laboratorio, se sabe

que el envejecimiento afecta la memoria episódica (Craik and Byrd, 1982). Un subtipo de memoria episódica es la denominada memoria de reconocimiento, que se define como la capacidad de recordar información previamente dada (Warburton and Brown, 2010) y comprende la familiaridad y el recuerdo de información. La memoria de reconocimiento puede separarse a su vez en el reconocimiento de localización de un objeto y en el reconocimiento de las características del mismo, y existe una especialización funcional de las estructuras dentro del sistema de memoria mencionado anteriormente (Deng et al., 2010; Deng et al., 2013). De este modo, el hipocampo tiene una función determinada, relacionada al contexto o la localización espacial (Warburton and Brown, 2010), mientras que el reconocimiento de objetos previamente presentados y la determinación de su familiaridad están ligados a la corteza perirrinal (PRh) (Haskins et al., 2008). En otras palabras, la consolidación de la memoria en cuanto a la localización del objeto parece depender del hipocampo, mientras que la consolidación de la memoria en las características del objeto ocurre en otras partes del cerebro como la PRh (Oliveira et al., 2010). Por otra parte, la memoria de reconocimiento que involucra el recuerdo de múltiples ítems y sus asociaciones contextuales o el orden temporal en que se encuentran los ítems, depende de las interacciones entre la PRh, el hipocampo y la corteza prefrontal media, y en este caso las tres estructuras son necesarias (la interacción de cualquiera de los pares no es suficiente) (Warburton and Brown, 2010).

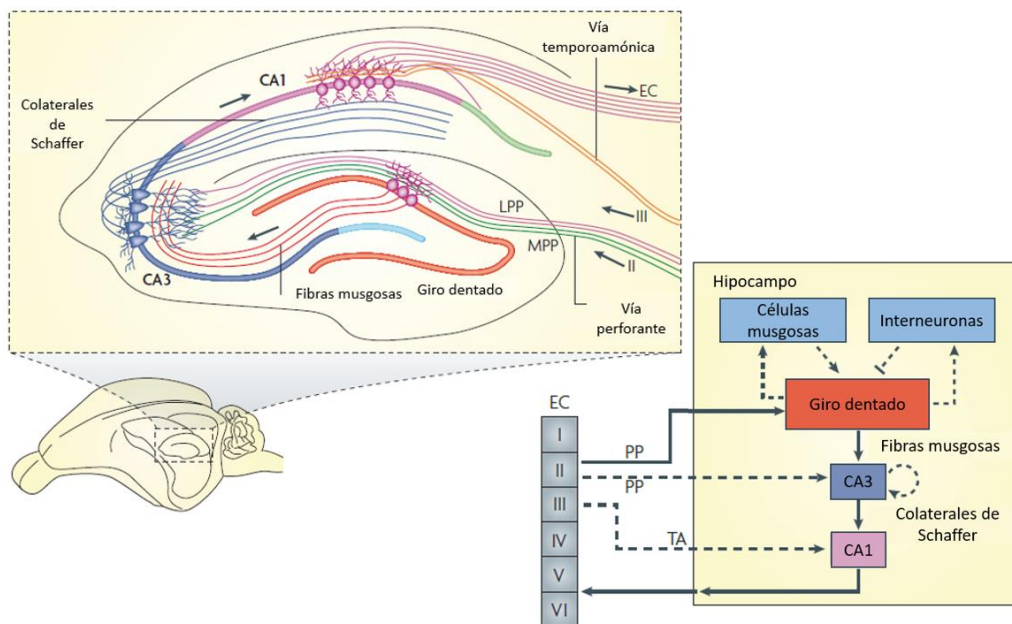


Figura 1.10. Circuito neuronal en el hipocampo de roedores adultos. El circuito trisináptico (corteza entorrinal (EC) – giro dentado – CA3 – CA1 – EC) está representado por las flechas continuas. Los axones de las neuronas en la capa celular II de la EC proyectan hacia el giro dentado a través de la vía perforante (PP), que abarca la vía perforante lateral (LPP) y la vía perforante medial (MPP). El giro dentado envía sus proyecciones a las células piramidales de la región CA3 a través de las fibras musgosas. Las células piramidales de CA3 transmiten la información a las células piramidales de CA1 mediante los colaterales de Schaffer. Las células piramidales de CA1 envían sus proyecciones hacia las neuronas de la capa más profunda de la EC cerrando el circuito. CA3 también recibe proyecciones directamente desde las neuronas de la capa celular II de la EC mediante la PP. CA1 recibe información de las neuronas de la capa celular III de la EC a través de la vía temporoamónica (TA). Las células granulares del giro dentado también proyectan a las células musgosas en el hilus y las interneuronas del hilus, que mandan proyecciones excitatorias e inhibitorias, respectivamente, a las células granulares. Figura adaptada de Deng et al., 2010.

Finalmente, hay un rol de tipos celulares no neuronales en el proceso de memoria. Las células de la glia (microglía, astrocitos y oligodendrocitos) actúan como soporte de las neuronas y las protegen. Cada subtipo de célula glial cumple una función: las células de la microglía patrullan en el parénquima del cerebro y se activan y proliferan rápidamente en respuesta a insultos (**Kreutzberg, 1996**), responden a activación neuronal (**Tremblay et al., 2010**) y remodelan el patrón de conexiones entre neuronas durante el desarrollo y la adultez (**Frost y Schafer, 2016**). Además, tienen un rol homeostático (**Wolf et al., 2017; Bachiller et al., 2018**). Varias patologías o desórdenes se correlacionan con una función impedida de dicho rol homeostático (entre ellas el envejecimiento). Los astrocitos tejen el sistema nervioso central e interactúan con vasos sanguíneos, proveen un soporte metabólico a las neuronas y suministran la energía necesaria para los cambios a largo plazo que subyacen la formación de la memoria y regulan el neurometabolismo (**Alberini et al., 2018; Sofroniew y Vinters, 2010**). Por último, los oligodendrocitos forman la vaina de mielina que protege los axones en el sistema nervioso central (**Fünfschilling et al., 2012**). La actividad neuronal inducida por una experiencia dispara la proliferación de los oligodendrocitos y la mielinización de los axones activos (**Steadman et al., 2020**). Esto es necesario para la consolidación de la memoria (**Pan et al., 2020**).

1.5.3 El engrama

Los engramas son los cambios específicos que se dan en el cerebro a causa de la experiencia y que se almacenan en un estado quiescente que se vuelve funcional bajo condiciones que conducen a la recuperación (**Pignatelli et al., 2019**). Se han identificado distintas poblaciones de neuronas que forman engramas para memorias particulares, a las cuales nos referiremos como células del engrama. Estas células se reactivan mediante señales específicas asociadas a la experiencia de entrenamiento y su estimulación puede provocar la recuperación de la memoria (**Liu et al., 2012; Ryan et al., 2015**). Los mecanismos por los cuales las células son seleccionadas para formar parte de un engrama no están del todo claros, pero se cree que hay varios factores implicados en este proceso. Se hipotetiza que el estado de excitación al momento del aprendizaje es clave para la asignación de una célula al engrama. El subtipo molecular, la ubicación (**Chawla et al., 2013; Erwin et al., 2020**), la edad (**Kee et al., 2007**) y el estado epigenético de la célula también influyen en su elegibilidad para formar parte del engrama.

Un engrama se forma y almacena como un patrón específico de conectividad neuronal entre las células (**Choi et al., 2018; Ryan et al., 2015**). Las sinapsis entre neuronas de un engrama son más fuertes que entre neuronas que no pertenecen a uno. La estabilidad de la conexión entre las células de un engrama contribuye al almacenamiento de la memoria y por tanto es necesaria para el proceso de recuperación de la misma, cuya eficacia está influenciada por factores ambientales como la disponibilidad y competencia de señales (**Riccio et al., 1984**). El éxito de la recuperación de la memoria puede influir en el equilibrio entre evitar situaciones amenazantes y explotar el medio ambiente, ambos procesos necesarios para la supervivencia de un animal (**Passano, 1957**).

1.5.4 Separación y terminación/finalización de patrones

En circunstancias naturales, cuando la disponibilidad de la señal es limitada, la recuperación de la memoria puede aprovechar un proceso mnemónico llamado terminación/finalización de patrones, que consiste en la capacidad de recuperar una memoria completa a partir de una señal sensorial parcial o degradada (**Marr, 1971**). Además, pueden surgir situaciones en las que estén presentes múltiples señales conflictivas, y su discriminación requiere un proceso adicional denominado separación de patrones, en el que se minimiza la superposición entre las representaciones (**O'Reilly y McClelland, 1994**).

1.6 Criopreservación

La criopreservación es un tipo de conservación de células, tejidos y órganos. Se realiza bajando lentamente la temperatura del núcleo hasta niveles de subcongelación por debajo de la llamada "temperatura de transición vítrea", en torno a los $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$, logrando la vitrificación – transformación de una sustancia a un estado similar al vidrio – en el proceso. Durante la vitrificación no se forma hielo ni intracelular ni extracelularmente y el cambio de volumen generado es menor que en una congelación normal. Para lograr esto, es necesaria una alta concentración de crioprotectores (**Wowk, 2007**), además de altas tasas de enfriamiento (suele utilizarse nitrógeno líquido, que tiene una temperatura de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) y tasas de recalentamiento extremadamente altas para evitar o disminuir al máximo la cristalización intracelular y/o la recristalización de pequeños cristales intracelulares, mejorando las técnicas preexistentes (**Fig. 1.11**). De esta manera se evita cualquier tipo de daño al ADN. Por lo general, se utiliza una mezcla de múltiples sustancias crioprotectoras, con el fin de equilibrar su toxicidad y capacidad de protección y causar el menor daño posible a las células. Mediante el enfriamiento y a través del proceso de criopreservación, las tasas metabólicas se reducen significativamente, deteniendo la actividad biológica por completo. Una vez vitrificado, el material biológico en cuestión queda en completa "pausa biológica", lo que significa que puede ser almacenado en este estado prácticamente de forma indefinida sin degradarse.

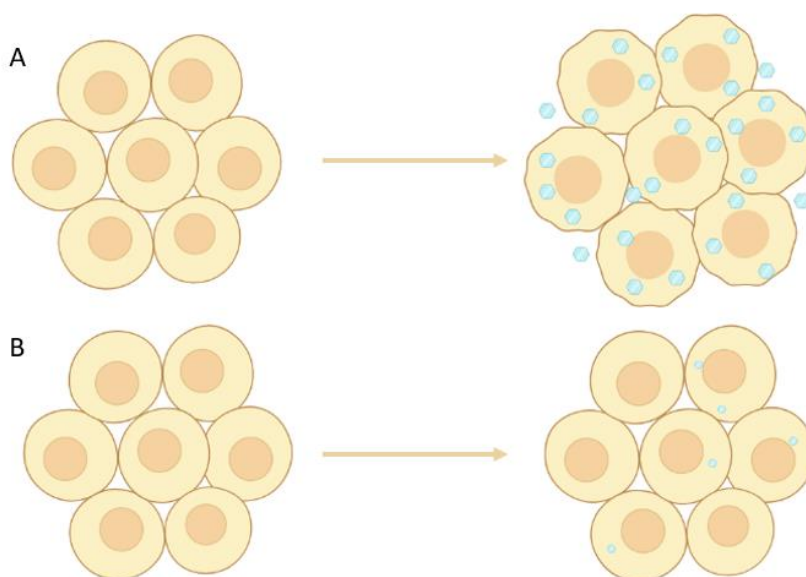


Figura 1.11. Congelamiento de células. **A)** Congelamiento ultrarrápido. Se observa la formación de cristales intra y extracelulares. **B)** Vitrificación. Se minimiza o elimina la formación de cristales.

En la actualidad, los rápidos avances de la criobiología y la tecnología de congelación están dando lugar a una certidumbre creciente sobre la viabilidad de la criopreservación reversible de órganos a temperaturas bajo cero, principalmente con el fin de crear bancos de órganos (**Giwa et al., 2017**). Existe evidencia sobre el logro de la criopreservación en riñones de conejo (**Fahy et al., 2009**) así como en ovarios enteros de oveja (**Campbell et al., 2014**). La criopreservación del sistema nervioso es un campo relativamente poco explorado; hasta el momento se han realizado estudios en organismos inferiores como *C. elegans*, demostrando que el sistema nervioso puede criopreservarse y recuperarse con éxito mediante procedimientos de congelación y descongelación superrápidos, preservando incluso la memoria de los especímenes entrenados (**Vita-More y Barranco, 2015**). En base a estos resultados, se puede pensar en un método de preservación de los cerebros mucho más sofisticado que el método utilizado hasta el momento – simplemente un almacenamiento en solución criopreservadora a - 20 °C–. Si bien este método permite conservar los cerebros hasta su utilización para análisis inmunohistoquímicos, muchas veces el tejido se ve levemente dañado. Mediante el uso de la técnica de vitrificación, se lograría conservar las conexiones y las células óptimamente. De este modo, la reproducibilidad de los experimentos realizados sería mucho más alta.

Capítulo II: Hipótesis y objetivos

La hipótesis central de la presente tesis es que la reprogramación celular mediada por los factores *oct4*, *sox2*, *klf4* y *c-myc* (OSKM) es capaz de generar un rejuvenecimiento parcial tanto *in vitro* como *in vivo*, restaurando parámetros celulares y cognitivos en la rata senil. De este modo, el objetivo general de este trabajo es la implementación de una estrategia terapéutica que nos permita revertir los cambios degenerativos que ocurren en el cerebro con el envejecimiento.

En base a este objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Generar un adenovector dependiente de auxiliar (HD, del inglés *helper-dependent*) de alta capacidad que exprese los cuatro genes de pluripotencia OSKM y el gen de la proteína verde fluorescente (GFP, del inglés *green fluorescent protein*) y caracterizarlo en fibroblastos de ratas adultas jóvenes, para luego implementar un protocolo de reprogramación directa en fibroblastos de ratas envejecidas.
2. Caracterizar cómo se ven afectados el hipocampo y la corteza perirrinal en los procesos de memoria de reconocimiento de objetos en nuestro modelo de envejecimiento, la rata hembra Sprague-Dawley (SD), tanto en la mediana edad como en la vejez, a fin de obtener un marco de referencia para evaluar los posibles efectos terapéuticos de los genes OSKM.
3. Poner a punto un reloj epigenético en nuestro modelo de envejecimiento, la rata hembra SD, a fin de tener un biomarcador preciso de edad al momento de evaluar los efectos de la terapia con los genes OSKM.
4. Implementar reprogramación celular en el hipocampo de las ratas envejecidas y evaluar los efectos a nivel cognitivo, así como en las poblaciones celulares del hipocampo.
5. Poner a punto un método de criopreservación de cerebros de rata que permita conservarlos durante un período más prolongado manteniendo las células y sus conexiones óptimas para su análisis.

Capítulo III: Construcción y caracterización del virus HD-OSKM

3.1 Objetivos específicos

- Generar un adenovector dependiente de auxiliar (HD, del inglés *helper-dependent*) de alta capacidad que exprese el cassette portador de los genes OSKM y el gen reportero de la proteína verde fluorescente (GFP).
- Propagar y purificar dicho adenovector.
- Caracterizar el adenovector (expresión correcta de todos los transgenes y regulabilidad) en fibroblastos de ratas adultas jóvenes.
- Aplicar un protocolo de reprogramación directa en fibroblastos de ratas adultas envejecidas y evaluar el efecto de dicho tratamiento.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Plásmido pC4HSU-STEMCCA-tTA

En el año 2009, Gustavo Motoslavsky de la Universidad de Boston, USA, y sus colaboradores diseñaron un sistema lentiviral expresando los cuatro genes de Yamanaka en un único transcrito multicistrónico. La expresión de este “stem cell cassette” (STEMCCA) logró, hasta ese momento, una de las formas más eficientes de conseguir iPSCs (**Sommer *et al.*, 2009**). Nuestro grupo ha completado la construcción de un plásmido bidireccional regulable Tet-Off (**Fig. 3.1**), portador del cassette STEMCCA, a partir de un plásmido que nos fue provisto por este investigador. El plásmido generado es un plásmido multicistrónico que expresa simultáneamente el gen reportero para la hGFP (*humanized green fluorescent protein*) y los cuatro genes de Yamanaka – *oct4*, *sox2*, *klf4* y *c-myc* (OSKM) – bajo el control de un promotor bidireccional regulable, que posee dos promotores mínimos de citomegalovirus (CMV) flanqueando a una región de respuesta a tetraciclina (PminCMV-TRE-PminCMV). En un sitio separado del plásmido, se clonó un constructo que expresa constitutivamente la proteína reguladora tTA. El tándem bicistrónico STEMCCA está constituido por la siguiente secuencia: *Oct4-f2A-Klf4-ires-Sox2-p2A-cMyc*, siendo IRES el sitio de reconocimiento ribosómico y *f2A* y *p2A* secuencias de autoprosesamiento. De esta manera, al ser traducidos, estos oligopéptidos producen un autoclivaje en su secuencia de aminoácidos. Este plásmido también porta las repeticiones terminales invertidas (ITRs) para el virus Ad 5, la señal de empaquetamiento y parte de la región adenoviral E4. Entre los dos ITRs hay una secuencia bacteriana flanqueada por sitios Pmel, sitios de restricción utilizados para linealizar el plásmido a la hora de generar el genoma viral.

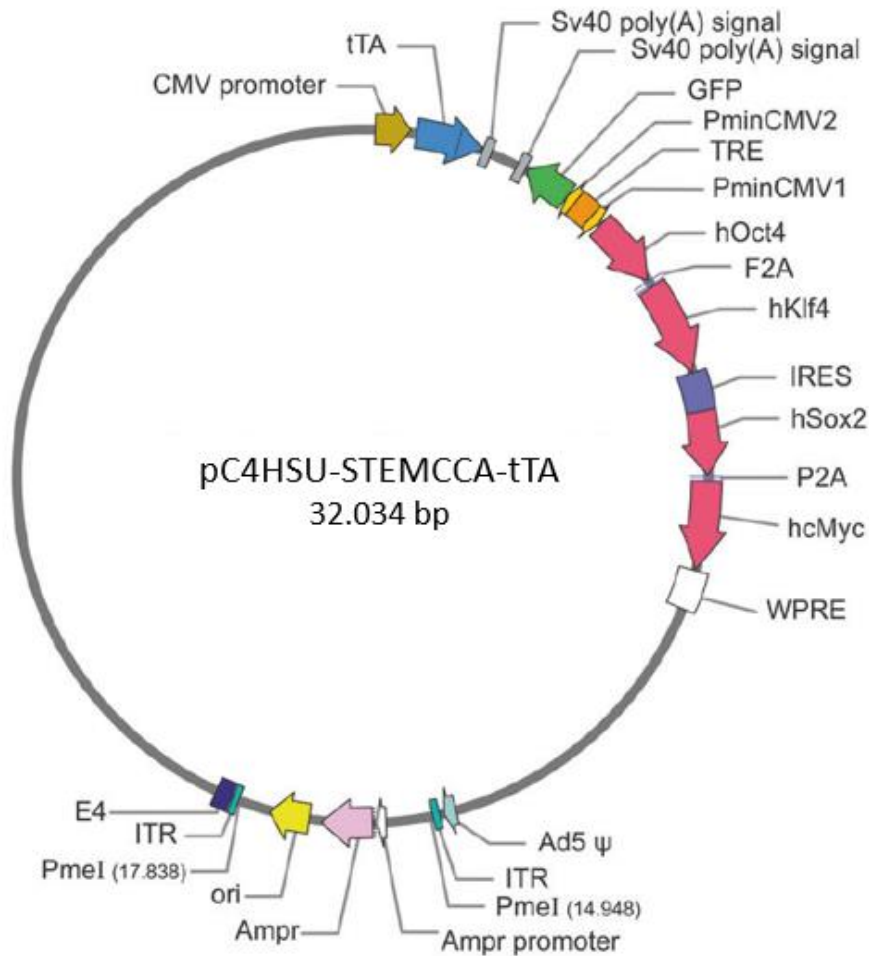


Figura 3.1. Plásmido pC4HSU-STEMCCA-tTA. Los genes de pluripotencia *oct4*, *klf4*, *sox2* y *cMyc* están agrupados en pares ubicados antes y después de un sitio interno de reconocimiento ribosómico (IRES). A su vez cada par de genes está separado por una secuencia CHYSEL tipo 2A que permite el autoclivaje del péptido naciente, con lo que se logra la co-expresión estequiométrica de los cistrones aguas arriba y abajo de la secuencia 2A. Además, el plásmido posee el cassette de regulación de la proteína tTA, que reprime la transcripción de los genes controlados por el promotor bidireccional por unión de doxiciclina (DOX). Las secuencias ITR y la señal de empaquetamiento son necesarias para la generación del adenovirus.

3.2.2 Generación del genoma viral

El plásmido pC4HSU-STEMCCA-tTA fue digerido con la enzima PmeI para eliminar la secuencia bacteriana, generando así el genoma del HD-RAAd-STEMCCA-GFP-Tet-Off deseado (**Fig. 3.2**), que de ahora en adelante llamaremos HD-OSKM.

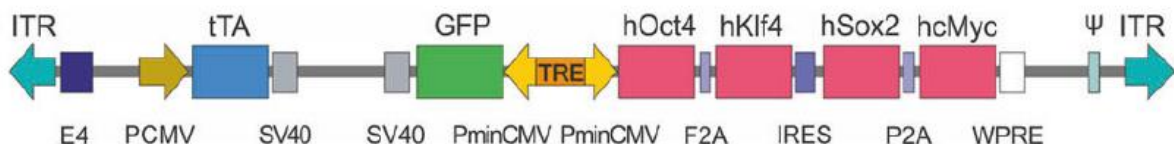


Figura 3.2. Genoma viral del HD-OSKM linealizado.

3.2.3 Cultivo de la línea celular HEK293 Cre

La línea celular HEK293 Cre expresa el gen de la recombinasa permeable celular Cre bajo el control del promotor CMV. Se utilizó la línea HEK293 Cre cat. # PD-080010, Microbix Biosystems Inc. Las células se descongelaron en 6 ml de DMEM completo (10 % SFB + ATB/ATM 10 ml/l) a 37 °C en una botella de cultivo T25 y se incubaron a 37 °C y con CO₂ al 5 %. Al día siguiente se les realizó un cambio de medio para eliminar los restos de DMSO que pudieran quedar del medio de congelamiento. Se mantuvieron en cultivo realizando cambio de medio cada tres días, hasta lograr una confluencia del 80-90 %.

3.2.4 Virus auxiliar H14

Como virus auxiliar se utilizó el virus H14, provisto por Microbix y amplificado en nuestro laboratorio, con un título de $2,75 \times 10^{10}$ ufp/ml. El H14 es un adenovirus de primera generación, con el gen E1 delecionado, y su señal de empaquetamiento flanqueada por sitios loxP (**Fig. 3.3**). Para evitar la formación de adenovirus competentes para la replicación, posee una secuencia de relleno en la región E3 para hacer que los recombinantes E1+ sean demasiado grandes para ser empaquetados.

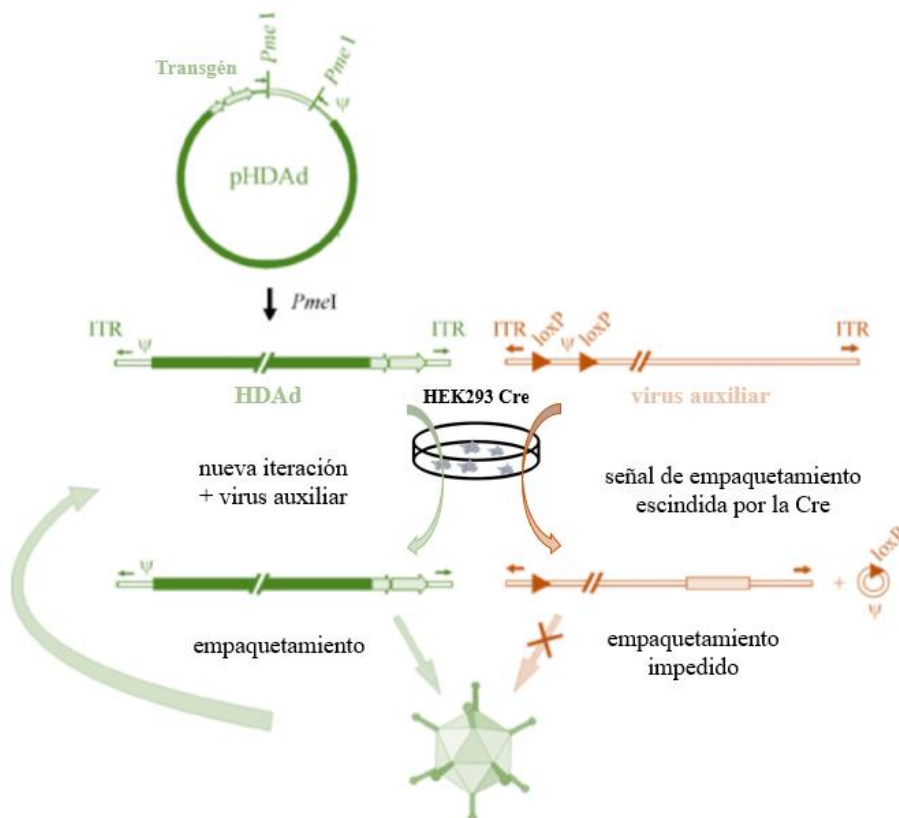


Figura 3.3. Sistema Cre/loxP para generar HDAd. El HDAd contiene solamente ~500 pb de las secuencias de Ad que actúan en cis requeridas para la replicación del ADN (ITRs) y el empaquetamiento (ψ). El resto del genoma consiste en las secuencias deseadas transgénicas y de relleno. El genoma HDAd se construye como un plásmido bacteriano (pHDAAd) y se libera por la digestión enzimática de restricción (por ejemplo, y tal como hicimos en nuestro caso, PmeI). Para rescatar el HDAd, el genoma liberado se transfecta en células HEK293 que expresan la recombinasa Cre, con un virus auxiliar que lleva una señal de empaquetamiento (ψ) flanqueada por sitios loxP. La escisión mediada por Cre de dicha señal de empaquetamiento hace que el genoma del virus auxiliar sea no empaquetable, pero sí capaz de proporcionar en trans todos los factores necesarios para la propagación del HDAd. El título del HDAd aumenta por las coinfecciones en serie de células 293 Cre con el HDAd y el virus auxiliar. Imagen adaptada de Rosewell *et al.*, 2011.

3.2.5 Generación del virus

Para generar el virus se realizó una transfección del genoma viral en células HEK293 Cre, seguida de una infección con el virus auxiliar. Se utilizó una botella T25 de células HEK293 Cre. Dos horas antes de realizar la transfección, las células se lavaron con PBS y se dejaron con 3 ml de medio DMEM sin aditivos. Se utilizó una relación de 2,5 μ l de lipofectamina 2000 por μ g de ADN. Se prepararon las diluciones de ADN (plásmido linealizado por digestión con la enzima PmeI) y lipofectamina (Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent, cat# 11668019, Invitrogen) por separado y luego se mezclaron, dejando 20 minutos a temperatura ambiente para que se formen los complejos. Se agregaron los complejos goteando lentamente, de a 100 μ l. 3,5 horas después, se retiró el medio con complejos y se lo reemplazó por 6 ml de DMEM completo (10 % SFB + ATB/ATM 10 ml/l). Al día siguiente, se retiró nuevamente el medio de la botella y se infectaron las células transfectadas con 0,44 μ l del virus auxiliar H14 (equivalentes a $1,21 \times 10^7$) en 3 ml de medio sin aditivos. Al cabo de una hora, se agregaron 3 ml de medio DMEM con SFB al 20 % para que quedara al 10 % final. Se espera observar, al cabo de cierto tiempo, células más redondeadas, a punto de desprenderse, o en su defecto ya levantadas, a causa de que el virus se generó y efectivamente está logrando infectar células y lisarlas (esto es lo que llamamos efecto citopático – ECP). Lo ideal es que el ECP sea evidente pero moderado. Habiendo pasado 48 horas post-infección (es decir, 72 horas post-transfección), se procedió a levantar las células de manera mecánica, haciendo uso de un rastrillo, y se volcó todo el contenido de la botella en un Falcon de 15 ml estéril. Se realizaron tres ciclos de congelamiento/descongelamiento (de 25 °C a -80 °C y viceversa) y se centrifugó 10 minutos a 201,1 x g (1000 rpm en centrífuga Sorvall GLC-2B con rotor HL-4 para tubos de 50 ml). El sobrenadante obtenido es el lisado crudo viral (LCV), en este caso LCV-0, por ser el lisado correspondiente al paso 0 (generación) (Fig. 3.4).

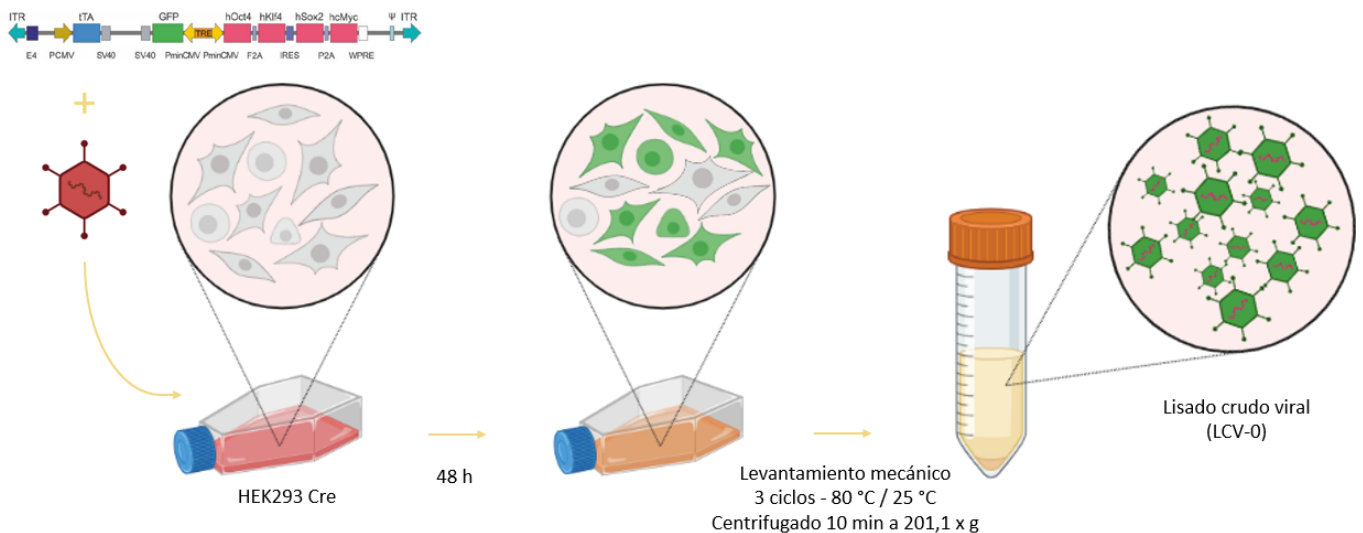


Figura 3.4. Generación del virus HD-OSKM. Se transfecta el genoma viral linealizado seguido de una infección con el virus auxiliar (rojo). Al cabo de 48 horas, se levantan las células, se hacen 3 ciclos de congelamiento/descongelamiento y se centrifuga para obtener el LCV, que contiene el virus HD-OSKM (verde).

3.2.6 Amplificación del virus

Para amplificar el virus generado, se realizó una serie de iteraciones: se coinfectó una nueva T25 con 3 ml del LCV-0 y 0,44 μ l de H14 (iteración 1). Una vez observado el ECP esperado, se levantaron las células y se procedió igual que en la iteración anterior, dando lugar al LCV-1, que se utilizó para coinfectar, junto con 0,6 μ l de H14, una botella T75 (iteración 2). De igual manera, se obtuvo el LCV-2, que se utilizó para coinfectar, junto con 1,22 μ l de H14, una botella T175 (iteración 3). El siguiente paso fue coinfectar 2 botellas T175 (iteración 4), luego 4 botellas T175 (iteración 5) y por último 48 botellas T175 (iteración 6) (**Fig. 3.5**). En esta última iteración, a diferencia del resto, al levantar las células y centrifugarlas, nos quedamos con el pellet, que es lo que se utiliza para purificar. Guardamos unos 15 ml de sobrenadante para lavar el pellet durante la obtención del lisado crudo final.

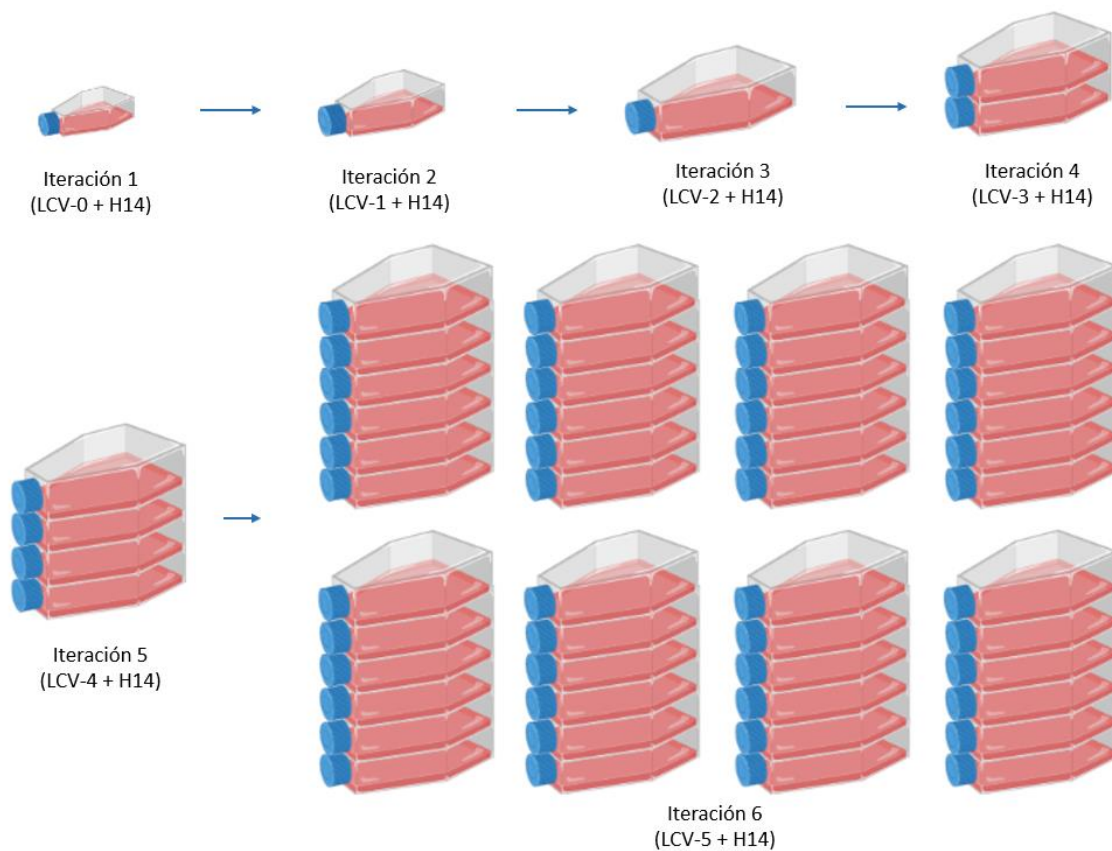


Figura 3.5. Proceso de amplificación del HD-OSKM. Se realizaron 6 iteraciones coinfectando el lisado proveniente del paso anterior y el virus auxiliar. Al final del proceso se generó el LCV-6 que fue el que se utilizó para la purificación.

3.2.7 Purificación del virus

La técnica elegida para la purificación de adenovectores es la ultracentrifugación en gradiente de CsCl, que consta de 5 etapas: obtención del lisado crudo, ultracentrifugación en gradiente discontinuo de CsCl, ultracentrifugación en gradiente isopícnico de CsCl 1,35 g/ml, diálisis, y fraccionamiento y almacenaje.

Obtención del lisado crudo

Una vez obtenido el pellet final resultante del proceso de amplificación del adenovector, se procedió al lisado de dichas células para que liberen las partículas virales. Para ello se sometió el pellet a 3 ciclos de congelamiento/descongelamiento (tal como se explicó para cada paso de la amplificación) y a continuación se centrifugó durante 15 minutos a 2050,8 x g (3000 rpm en centrífuga Beckman Coulter Allegra 6R con rotor GH-3.8) (una mayor aceleración disminuye el porcentaje de recuperación viral). El sobrenadante obtenido, denominado lisado crudo, se colectó en un tubo Falcon estéril de 15 ml y se reservó en hielo. Se resuspendió el pellet remanente de dicha centrifugación en 2 ml del sobrenadante guardado y se repitió el proceso de centrifugado a fin de rescatar más partículas virales. Para evitar la dilución del lisado crudo original, el sobrenadante así obtenido se manipuló como una alícuota separada.

Ultracentrifugación en gradiente de CsCl

Se llenaron 6 tubos de ultracentrífuga, en esterilidad y muy lentamente, formando capas de CsCl de distintas densidades que no deben mezclarse, en el siguiente orden:

- 0,2 ml de CsCl densidad de 1,5 g/ml
- 1,1 ml de CsCl densidad de 1,35 g/ml
- 1,1 ml de CsCl densidad 1,25 g/ml
- 2 ml del lisado crudo viral (HD-OSKM a purificar)

Luego de colocado el volumen correspondiente al CsCl densidad 1,35 g/ml se procedió a hacer una pequeña y suave marca en la pared del tubo con el fin de facilitar la posterior identificación de la banda correspondiente al adenovector semi-purificado.

Una vez finalizado el armado de los tubos, los mismos se colocaron dentro de los buckets de la centrífuga y se pesó dicho conjunto para equilibrarlos de a pares, prestando especial atención a la numeración y peso particular de cada bucket de manera que aquellos de las mismas características queden enfrentados dentro del rotor, dado que el equipo es muy sensible y podría dañarse si esto no se cumple. Se centrifugó a 272109,6 x g (45000 rpm en ultracentrífuga Beckman Coulter con rotor SW60Ti) durante 1 hora a 10 °C (Beckman Coulter Optima LE-80K Ultracentrifuge). Una vez finalizada la ultracentrifugación, en los 6 tubos se desechó la capa que estaba por encima de la banda, se recolectó la banda de virus en el menor volumen posible (en dos tubos Eppendorf estériles) y se determinó el volumen total.

Ultracentrifugación en gradiente isopícnico de CsCl 1,35 g/ml

Las bandas de virus obtenidas en el paso previo se purificaron por ultracentrifugación en gradiente isopícnico de CsCl de densidad 1,35 g/ml, para lo cual se llenaron 2 tubos con ~3.3 ml CsCl y ~1.1 ml de virus semi-purificado por sobre el CsCl.

De la misma manera que se realizó para la ultracentrifugación anterior, los tubos se colocaron en los buckets, se los pesó y se completó volumen, en caso de ser necesario, con CsCl $\delta=1,35$ g/ml. Luego se ultracentrifugaron a 272109,6 x g (45000 rpm en ultracentrífuga Beckman Coulter con rotor SW60Ti), a 4 °C, durante 18 horas. Nuevamente se recolectó la banda correspondiente al vector adenoviral en un tubo Eppendorf en hielo y se determinó el volumen total.

Diálisis

Este paso se realizó a 4 °C con agitación constante. Se acondicionó previamente la membrana de diálisis mediante 10 minutos de ebullición en una solución 0,5 M de EDTA (pH 8) con bicarbonato de sodio al 2 % seguidos de 10 minutos de ebullición en una solución 0,5 M de EDTA (pH 8) y varios lavados con agua destilada estéril. Se cerró la membrana de diálisis con un clip plástico en uno de los extremos y se colocó la banda viral recolectada de la segunda ultracentrifugación. Se retiró el aire y se cerró el otro extremo de la membrana. En este extremo se ató una piola que permitió anclarla al vaso de precipitado donde previamente se colocó 1 litro del buffer de diálisis, de modo que la membrana quedase completamente sumergida pero sin tocar el buzo magnético que se colocó en el fondo del recipiente. Se dializó 21 horas con agitación leve, renovando el Buffer de diálisis por completo a las 2, 4 y 6 horas.

Fraccionamiento y almacenaje

Una vez finalizada la diálisis, se retiró el contenido de la membrana en esterilidad, se cuantificó y se agregó glicerol 80 % hasta una concentración final de 10 %:

$$\text{Volumen de Glicerol 80 \%} = \text{Volumen de la banda viral} \times 0,14$$

A esta preparación de HD-OSKM se la alicuotó en tubos Eppendorf de 0,5 µl, previamente rotulados con el nombre del vector, número de lote, fecha y volumen. Finalmente se almacenaron dichas alícuotas a - 80 °C.

3.2.8 Titulación del virus por espectrofotometría

Se realizó por triplicado una dilución 1/10 de la muestra del virus en 0,1 % de SDS en PBS, realizando la misma dilución del buffer de diálisis en 0,1 % de SDS para utilizarla como blanco. La mezcla se homogenizó por vórtex y se centrifugó a 5468,8 x g (8000 rpm en centrífuga Hanil Combi R515 con rotor A2.0-24 para tubos de 0,5 ml) durante 5 minutos. Se determinó la absorbancia del sobrenadante a 260 nm haciendo uso del NanoDrop Lite (Thermo Scientific). La relación $Abs_{260/280}$ debe encontrarse en el rango de 1,2 – 1,6. Se calculó así la concentración de partículas virales físicas a partir del promedio de la Abs_{260} . Para ello se utilizó la fórmula de peso molecular para ADN de doble cadena provista en la página de Thermo Fisher (<https://www.thermofisher.com/ie/en/home/references/ambion-tech-support/rna-tools-and-calculators/dna-and-rna-molecular-weights-and-conversions.html>):

$$MW_{dsDNA} = (n^{\circ} \text{nucleótidos} \times 607,4) + 157,9$$

3.2.9 Cultivo primario de fibroblastos

Se obtuvieron fibroblastos de cola de rata por cultivo primario. Se anestesiaron las ratas por inhalación de isofluorano. Se realizó un corte con bisturí estéril a 5 cm de la punta de la cola. Cada punta de cola extraída se colocó en un Falcon estéril con 40 ml de etanol 70 %, y posteriormente se pasó a una placa de Petri cerca de mechero durante 5 minutos para secar. Luego se transfirió cada cola a una placa nueva, esta vez con 10 ml de medio DMEM con ATB/ATM y alta concentración de glucosa. Se removieron los pelos con tijera o bisturí estéril, se enjuagó con medio nuevo y por último se separó el tejido del hueso y se cortó en varios pedazos pequeños, que se colocaron en tubos de 2 ml con una solución de colagenasa tipo IV

(245 U/mg – se utilizaron 1000 unidades (U) de colagenasa por cola). Se incubaron los tubos durante 90 minutos a 37 °C y con agitación de 200 rpm. A partir de este punto se trabajó en flujo laminar. Se añadieron 6 ml de DMEM completo (10 % SFB + ATB/ATM 10 ml/l) y se procedió a esterilizar por filtración (filtro de 40 µm). Se enjuagó el filtro con 6 ml más de DMEM. Se realizaron dos lavados centrifugando durante 7 minutos a 162,9 x g (900 rpm en centrífuga Sorvall GLC-2B con rotor HL-4 para tubos de 50 ml) y descartando el sobrenadante. Se procedió a resuspender el último pellet en 6 ml de DMEM completo y a cultivarlo en una botella de cultivo T25. Se incubaron a 37 °C y CO₂ al 5 %, cambiando el medio por medio fresco cada 3 días. Al llegar a un 90 % de confluencia se repicaron las células incubando con tripsina 0,17 % + EDTA (levantamiento químico) durante 5 minutos y frenando la reacción con el triple de volumen de DMEM completo. Se resuspendieron con pipeta y se llevaron a una botella T175 para amplificar.

Una vez lograda dicha amplificación, se congeló cada lote de células a fin de tener stock para las siguientes pruebas. El medio de congelamiento utilizado se preparó con 50 % de SFB, 40 % de medio DMEM y 10 % de DMSO (agente crioprotector). Es importante que las células pasen entre 15 y 40 minutos en este medio para permitir que se estabilicen sin metabolizar el DMSO (lo cual resultaría tóxico). A su vez, el congelamiento debe ser gradual. Para ello se utiliza un artefacto que logra una velocidad de enfriamiento muy cercana a - 1 °C/minuto, la velocidad óptima para la preservación celular. Luego de 24 horas a - 80 °C en este dispositivo, los viales pueden almacenarse a - 196 °C.

Al momento de usar estos fibroblastos, se descongelaron los viales necesarios en medio DMEM completo a 37 °C, recibiendo un cambio de medio a las 24 horas con el fin de eliminar cualquier resto de DMSO que pudiera quedar del medio de congelamiento. Se realizó el mantenimiento de dichas células efectuando un cambio de medio cada 3 días hasta alcanzar la confluencia deseada para los ensayos (en general 80-90 %). Para cada ensayo se plaquearon fibroblastos en placas de 24 pocillos, a razón de 20000 células/pocillo.

3.2.10 Medida de la fluorescencia en el tiempo

Se infectaron 2 pocillos de una placa de fibroblastos provenientes de ratas de 2 meses de edad con el HD-OSKM purificado. Con el objeto de evaluar la expresión del gen reportero en las células transducidas, tomamos imágenes de las mismas durante 5 días de cultivo.

3.2.11 Curva dosis respuesta

Se infectaron 8 pocillos de una placa fibroblastos provenientes de ratas de 2 meses de edad con el HD-OSKM purificado. Se tomaron 2 pocillos como controles negativos de la infección, y con los 8 infectados se realizaron duplicados de 4 condiciones de agregado de doxiciclina: 0, 50, 100 y 500 ng/ml. La DOX se agregó, en los pocillos correspondientes, al momento de plaquear las células (día - 1). A los 3 días post-infección se realizó cambio de medio y se volvió a agregar DOX. Al cuarto día se procedió a la lisis de las células para medir la absorbancia de cada pocillo y obtener la curva dosis-respuesta deseada (Beckman Coulter DTX 880 Multimode Detector).

3.2.12 Inmunocitoquímica

Chequeo de expresión de los genes de pluripotencia en las células transducidas

Se infectaron 16 pocillos de una placa fibroblastos provenientes de ratas de 2 meses de edad con el HD-OSKM purificado. Se tomaron 2 pocillos como controles negativos de la infección, y con los 16 infectados se realizaron duplicados de las marcaciones correspondientes a cada uno de los cuatro genes de Yamanaka (*oct4*, *sox2*, *klf4* y *c-myc*) para dos condiciones distintas: con y sin agregado de DOX (1000 ng/ml). La DOX se agregó en los pocillos correspondientes al momento de plaquear las células (día - 1). La placa se mantuvo en cultivo durante 3 días antes de realizar la inmunomarcación.

Los anticuerpos primarios que se utilizaron fueron los siguientes:

- 1) Anticuerpo monoclonal de ratón anti-OCT4 (dilución 1/45, Invitrogen, MA1-104).
- 2) Anticuerpo monoclonal de ratón anti-SOX2 (dilución 1/40, Invitrogen, MA1-014).
- 3) Anticuerpo monoclonal de ratón anti-KLF4 (dilución 1/100, Abcam, ab75486).
- 4) Anticuerpo monoclonal de ratón anti-CMYC (dilución 1/50, Invitrogen, 132500).

Para realizar estas marcaciones, se fijaron las células con formol al 10 % en PBS durante 10 minutos. Luego se permeabilizaron las células durante 30 minutos (Perm/Wash buffer en agua destilada). Se utilizó para la detección el kit ABC universal Vectastain® (1:500, Vector Laboratories, PK-6100) que emplea 3,3-diamino bencidina tretrahidro-cloruro (DAB) como cromógeno. Brevemente, después de la incubación durante toda la noche con el anticuerpo primario a 4 °C, las células se incubaron con un anticuerpo biotinilado de caballo anti-ratón (dilución 1/300, Vector Laboratories, BA-2000) durante 120 min. Posteriormente, se enjuagaron e incubaron con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (kit ABC) durante 90 min y luego se incubaron con DAB.

Evaluación del efecto terapéutico del virus en las células transducidas

Para estudiar el efecto del virus en estas células, se evaluaron algunos marcadores de envejecimiento en fibroblastos de ratas viejas (28 meses) tratadas con sólo 3 días de expresión continua de los genes, viejas (28 meses) sin tratar y jóvenes (2 meses). En este caso lo que se buscó fue obtener una reprogramación parcial de las células que logre un rejuvenecimiento epigenético de las mismas. Los marcadores de envejecimiento analizados fueron γ H2AX, 53BP1 y LAP2. El análisis se realizó mediante inmunocitoquímica (ICQ) de fluorescencia. γ H2AX es una molécula asociada a la respuesta a daño en el ADN que se ha establecido como un marcador molecular de ruptura de doble cadena, por tanto, se encuentra acumulado en células senescentes, en las cuales hay altos niveles de daño de ADN. 53BP1 también tiene un rol importante en la respuesta a daño del ADN, pero a diferencia del marcador anterior, el envejecimiento trae aparejado un déficit en su reclutamiento. LAP2, por otro lado, es una proteína que se encuentra en la membrana nuclear interna de las células y tiene funciones importantes en la estabilidad y organización de la cromatina, mediando la unión membrana-cromatina y regulando la replicación de la misma mediante cambios en su estructura (se ha demostrado que esta proteína interactúa directa o indirectamente con histonas y factores de remodelación de la cromatina). Se ha reportado una disminución de sus niveles en células senescentes.

Los anticuerpos primarios utilizados para las marcaciones fueron los siguientes:

- 1) Anticuerpo recombinante monoclonal de conejo anti-Phospho-gamma-H2AX (Ser139) (marca la histona H2AX, variante de la familia de proteínas H2A, solo cuando la misma está fosforilada en la serina 139, no presenta reactividad cruzada con otras histonas fosforiladas; dilución 1/500, Thermo Fisher, MA5-33062).
- 2) Anticuerpo policlonal de conejo anti-53BP1 (marcador de la proteína nuclear implicada en la señalización del daño al ADN – *p53-Binding Protein 1*; dilución 1/1000, Abcam, ab172580).
- 3) Anticuerpo policlonal de conejo anti-LAP2 (marcador de la proteína LAP2 – *lamina-associated polypeptide 2* – involucrada en la organización estructural del núcleo; dilución 1/500, Thermo Fisher, PA1-5828).

Se utilizó el siguiente anticuerpo secundario:

- 1) Alexa 555 de cabra anti-conejo (dilución 1/300, Invitrogen, F001).

Para realizar estas marcaciones, se fijaron las células con formol al 10 % en PBS durante 10 minutos. Luego se permeabilizaron las células durante 30 minutos (Perm/Wash buffer en agua destilada). Para la detección, directamente se utilizó el anticuerpo secundario. Luego de la incubación durante toda la noche con el anticuerpo primario a 4 °C, se incubó con el anticuerpo secundario conjugado a un fluoróforo durante 120 minutos, protegiendo la placa de la luz.

3.2.13 Obtención y análisis de imágenes

Para la toma de imágenes se utilizó un microscopio Olympus IX71 conectado a una cámara Nikon D3500. Se tomaron imágenes de varios campos, siempre siguiendo un mismo orden, con el fin de abarcar la totalidad del pocillo a analizar (se tomaron imágenes de cada pocillo con su duplicado). Para el análisis de las imágenes correspondientes a la ICQ de fluorescencia se utilizó el programa ImageJ 1.52u (NIH, USA). Se organizaron las imágenes en carpetas que contuvieran las 3 imágenes de cada campo juntas: contraste de fase, fluorescencia verde (GFP) y fluorescencia roja (marcador correspondiente). Desde el ImageJ se importó cada secuencia permitiendo ver la colocalización de la fluorescencia de la GFP y del marcador. Se utilizaron como células control aquellas que no presentaban fluorescencia ni verde ni roja (células no infectadas). Para medir la intensidad de fluorescencia, se seleccionó cada célula de interés (mediante la herramienta de dibujo de forma libre) y se midieron los parámetros “area integrated intensity” (suma de la intensidad de píxeles sobre todos los píxeles de un objeto) y “mean gray value” (suma de los valores grises de todos los píxeles de la selección dividida por el número de píxeles), tomando como referencia tres zonas alrededor de la célula de interés en las que no haya fluorescencia para poder restarla (ruido de fondo). Se calculó la fluorescencia total corregida de cada célula (CTCF, por sus siglas en inglés *corrected total cell fluorescence*) mediante la siguiente fórmula:

$CTCF = intensidad\ integrada - (\text{área de la célula seleccionada} \times fluorescencia\ promedio\ de\ las\ zonas\ elegidas\ como\ ruido\ de\ fondo)$

3.2.14 Análisis estadístico

Se analizó la distribución de las muestras a fin de determinar el método estadístico a utilizar. En el caso de LAP2, se encontró una distribución normal, por lo que se utilizó el test paramétrico de Student (t-test). Por el contrario, en el caso de γ H2AX y 53BP1, la distribución de las muestras no fue normal, por lo que se utilizó el test no paramétrico de Friedman.

3.3 Resultados

3.3.1 Generación del virus

Pasadas 24 horas de la infección con el virus auxiliar (48 horas luego de la transfección con el plásmido portador de los genes de interés) se observaron bastantes células levantadas. Esto podría deberse al efecto citopático (ECP) del virus o bien simplemente ser un efecto del tratamiento, dado que las células atravesaron una transfección seguida de una infección, lo cual puede ser bastante agresivo para las mismas. A las 48 horas se observó un ECP suficiente como para levantar las células (**Fig. 3.6**). Se generó el LCV-0 a partir de la lisis de estas células y el mismo se utilizó para infectar la próxima T25, comenzando con la amplificación del HD-OSKM.

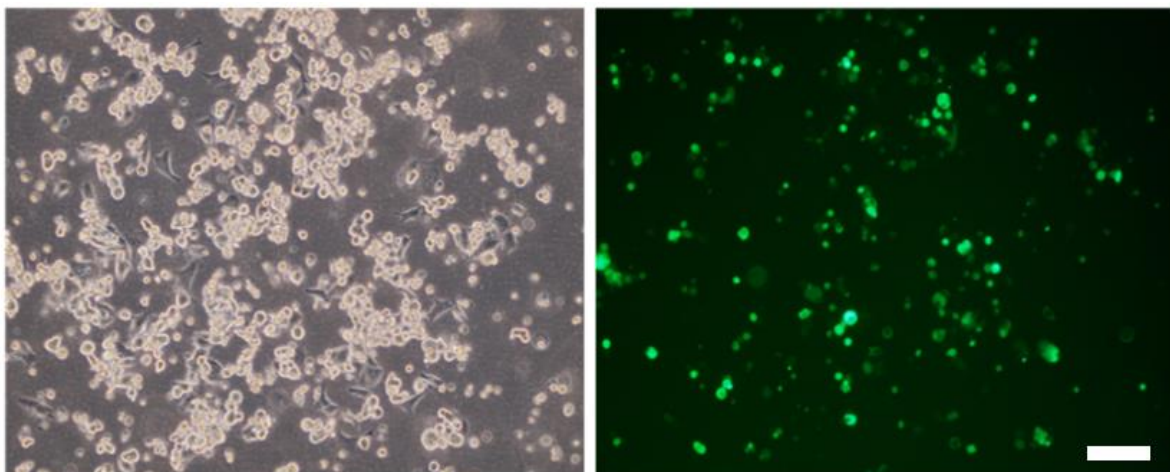


Figura 3.6. Generación del vector HD-OSKM: células transfectadas con el genoma viral e infectadas con el virus auxiliar. Imágenes tomadas inmediatamente antes de levantar las células (48 h post-infección/72 h post-transfección). Escala: 100 μ m.

3.3.2 Amplificación del virus

La amplificación del virus fue exitosa, logrando una buena intensidad de fluorescencia y un adecuado ECP en cada una de las iteraciones (**Fig. 3.7**).

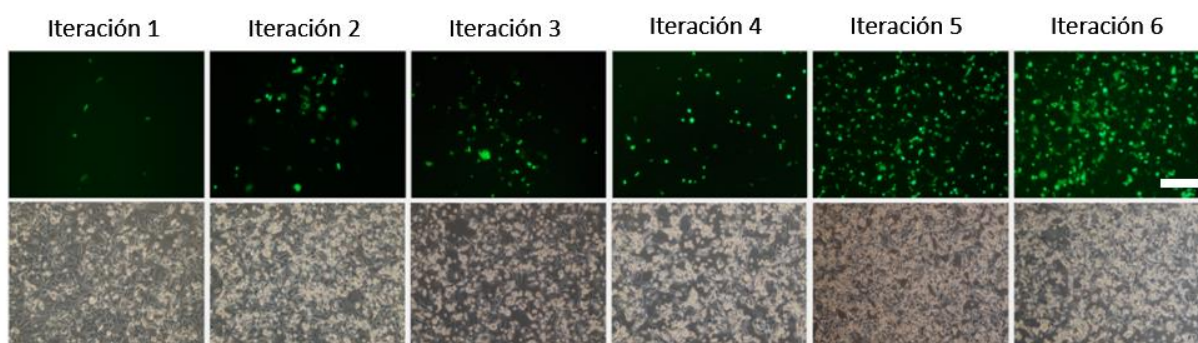


Figura 3.7. Amplificación del HD-OSKM. Se observa un aumento de la fluorescencia a medida que se avanza con las iteraciones. Escala: 200 μm .

3.3.3 Purificación del virus

La purificación del virus también se llevó a cabo de manera exitosa. Se obtuvo un volumen de lisado crudo final de 12 ml, que se colocó de a 2 ml en los 6 tubos de ultracentrífuga que se utilizaron durante la ultracentrifugación en gradiente de CsCl. Los tubos se llenaron como se describe en la sección 3.2.7, realizando una marca luego del agregado de la solución de CsCl de densidad 1,35 g/ml para facilitar la posterior identificación de la banda correspondiente al adenovector semi-purificado (**Fig. 3.8 A**). Al finalizar esta primera ultracentrifugación, se observó una banda blanquecina por encima de la capa de CsCl $\delta=1,35$ g/ml, apenas debajo de la marca realizada (**Fig.3.8 B**).

Se recolectaron todas las bandas de virus y se determinó el volumen final que fue de 2,2 ml. Dicho volumen se repartió en dos tubos Eppendorf con 3,3 ml de CsCl 1,35g/ml y se procedió a la ultracentrifugación en gradiente isopícnico. Al día siguiente, retiramos los tubos de sus respectivos buckets para recolectar las bandas de virus purificado. Las bandas obtenidas fueron un poco menos gruesas de lo que se esperaba, pero aun así eran bandas nítidas (**Fig. 3.8 C**).

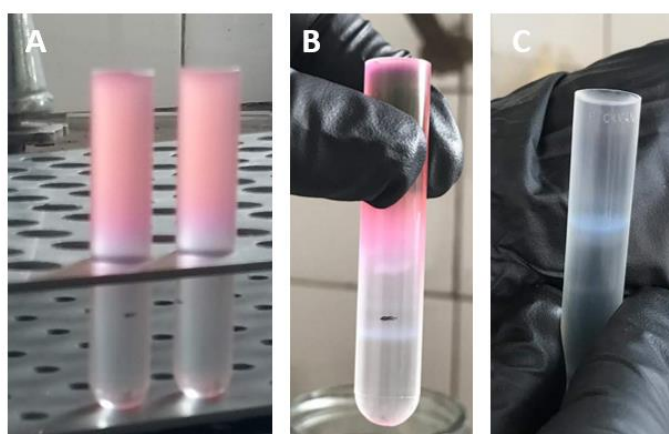


Figura 3.8. Purificación del HD-OSKM por ultracentrifugación en gradiente de CsCl. **A)** Tubos de ultracentrífuga preparados para la ultracentrifugación en gradiente de CsCl, conteniendo de abajo hacia arriba las soluciones de CsCl de δ 1,5 g/ml, 1,35 g/ml, 1,25 g/ml y el lisado crudo viral. Se observa la marca realizada luego de agregar la solución de δ 1,35 g/ml para la posterior identificación de la banda viral. **B)** Banda de virus semi-purificado obtenida luego de la ultracentrifugación en gradiente de CsCl. **C)** Banda de virus purificado obtenida luego de la ultracentrifugación en gradiente isopícnico de CsCl.

Luego de dializar se agregó la cantidad de glicerol correspondiente al volumen final obtenido y se realizaron alícuotas de distintos volúmenes para almacenar a - 80 °C.

3.3.4 Titulación del virus por espectrofotometría

Se realizó la lisis de tres diluciones 1/10 del virus en una solución 0,1 % de SDS en PBS y se midieron sus absorbancias utilizando como blanco la lisis de la dilución del buffer de diálisis en las mismas condiciones. Previo a medir las absorbancias, las diluciones se resuspendieron por vórtex y se centrifugaron a 5468,8 x g (8000 rpm en centrífuga Hanil Combi R515 con rotor A2.0-24 para tubos de 0,5 ml) durante 5 minutos. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

	C (ng/μl)	A ²⁶⁰	A ^{260/280}
Muestra 1	4,6	0,093	1,38
Muestra 2	3,6	0,073	1,28
Muestra 3	3,4	0,068	1,29

Para calcular la cantidad de partículas virales, tomamos el promedio de las concentraciones (3,87 ng/μl) y utilizamos la siguiente fórmula de peso molecular para ADN de doble cadena:

$$MW_{dsDNA} = (n^{\circ} \text{nucléotidos} \times 607,4) + 157,9$$

El tamaño del plásmido portador del genoma viral es de 32034 pb (n° nucléotidos). Al calcular el peso molecular de nuestro plásmido con la fórmula anterior, obtenemos que es de 19457609,5 g/mol. El promedio de las concentraciones obtenidas de las muestras de virus viene de una dilución 1/10, de modo que es 38,7 ng/μl (3,87 ng/μl x 10), es decir 3,87x10⁻⁵ g/ml. Tomando el peso molecular obtenido, estos 3,87x10⁻⁵ g equivalen a 1,99x10⁻¹² moles. Del mismo modo, dado que un mol son 6,023x10²³ partículas (constante de Avogadro), si tenemos 1,99x10⁻¹² moles, tenemos 1,2x10¹² partículas (en nuestro caso partículas virales). Así, el título de nuestro virus purificado es de 1,2x10¹² partículas virales/ml.

3.3.5 Cultivo primario de fibroblastos

Se logró cultivar con éxito fibroblastos provenientes tanto de ratas de 2 meses como de ratas de 28 meses (**Fig. 3.9**). Su congelamiento también fue exitoso, permitiendo la utilización de estos fibroblastos para posteriores pruebas de caracterización del virus obtenido.

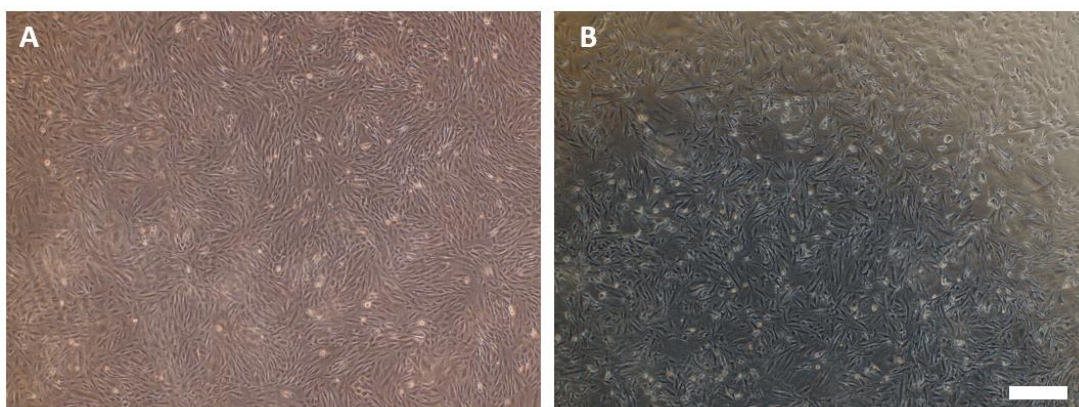


Figura 3.9. Cultivo primario de fibroblastos. **A)** Fibroblastos provenientes de rata de 2 meses a los 8 días de cultivo. **B)** Fibroblastos provenientes de ratas de 28 meses a los 8 días de cultivo. Escala: 200 μm.

3.3.6 Medida de la fluorescencia en el tiempo

Se muestra a continuación la expresión de la GFP en fibroblastos provenientes de ratas de 2 meses transducidos con el HD-OSKM purificado desde el día de la infección hasta el día +5 post-infección (**Fig. 3.10**).

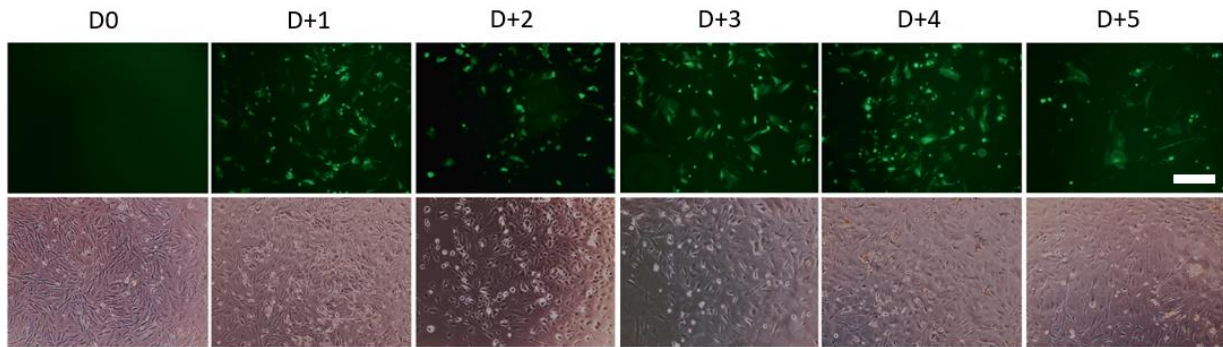


Figura 3.10. Time-course de la expresión de la proteína fluorescente verde en fibroblastos de 2 meses desde el día de la infección (D0) hasta el día 5 post-infección (D+5). Escala: 200 μ m.

3.3.7 Curva dosis respuesta

Tal como se esperaba obtener, la expresión de la GFP se vio atenuada e incluso apagada por el agregado de DOX, lo cual indica que el sistema regulable está funcionando correctamente. Se observó que al cuarto día de cultivo con agregado de DOX en los casos correspondientes, con el agregado de 50 ng/ml de DOX había algo de fluorescencia, mientras que el agregado de 100 ng/ml de DOX tuvo un efecto muy similar al agregado de 500 ng/ml, de modo que agregar 100 ng/ml de DOX es suficiente para lograr que la GFP deje de expresarse (**Fig. 3.11**).

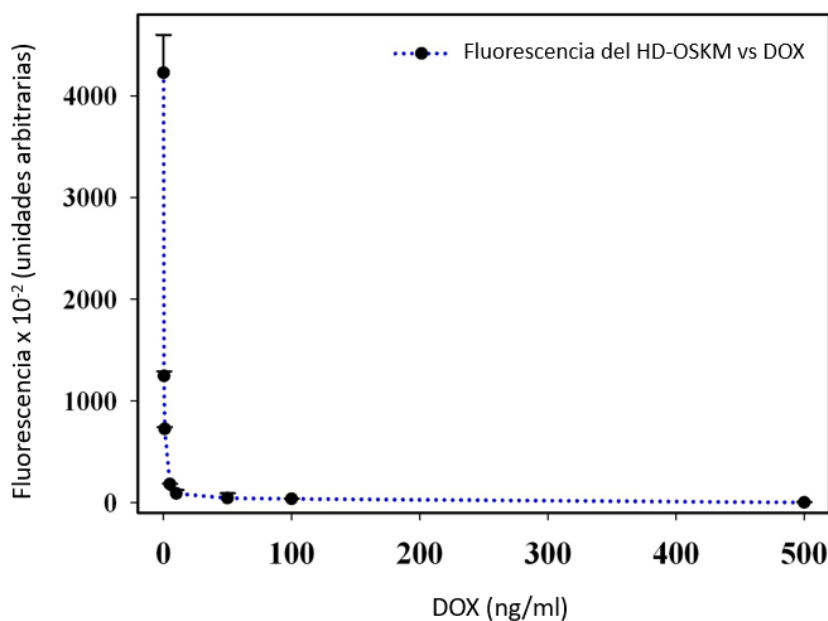


Figura 3.11. Fluorescencia del HD-OSKM en función del agregado de DOX al día +4 post-infección. La fluorescencia se atenúa a niveles cercanos a cero en los casos en que las células recibieron concentraciones de DOX de 100 ng/ml o mayores.

3.3.8 Inmunocitoquímica

Chequeo de expresión de los genes de pluripotencia en las células transducidas

Se observó por inmunocitoquímica que los fibroblastos transducidos con el virus purificado expresaban los cuatro genes de pluripotencia. Además, se comprobó que el agregado de DOX logra apagar la expresión de los mismos y que la represión dura hasta el día +3 post-infección, que es el momento en el cual se realizó la inmunocitoquímica. Se observa también que hay un poco de expresión en los fibroblastos sin transducir (similar al nivel de expresión observado en los fibroblastos que fueron tratados con DOX) (**Fig. 3.12**). Esto se debe a que estos genes se expresan endógenamente, pero al ser genes de pluripotencia, esta expresión es muy baja en células como los fibroblastos, que son células totalmente diferenciadas.

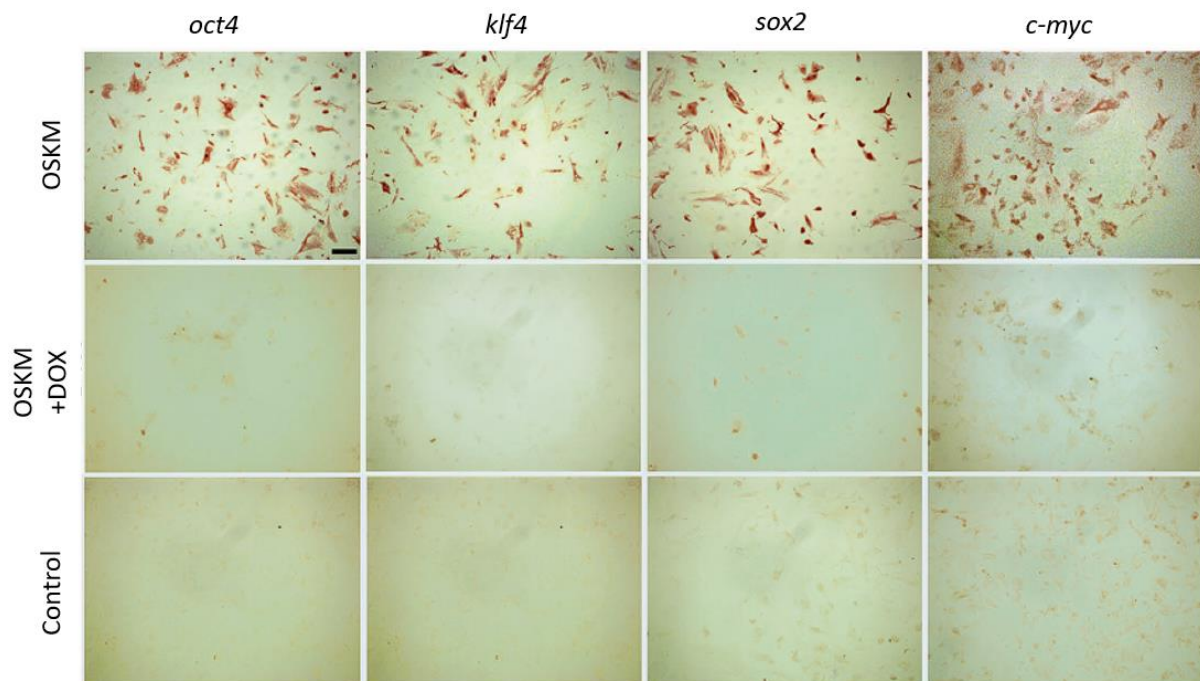


Figura 3.12. Inmunocitoquímica de los cuatro genes de pluripotencia *oct4*, *klf4*, *sox2* y *c-myc* en fibroblastos provenientes de ratas de 2 meses. Las células teñidas de marrón son las células inmunorreactivas. Escala: 200 μ m.

Evaluación del efecto terapéutico del virus en las células transducidas

Para γ H2Ax, si bien se esperaba que el tratamiento redujera los niveles de esta proteína, se encontró una reducción en el nivel de fluorescencia que no fue significativa ($p=0,68319$) (**Fig. 3.13**).

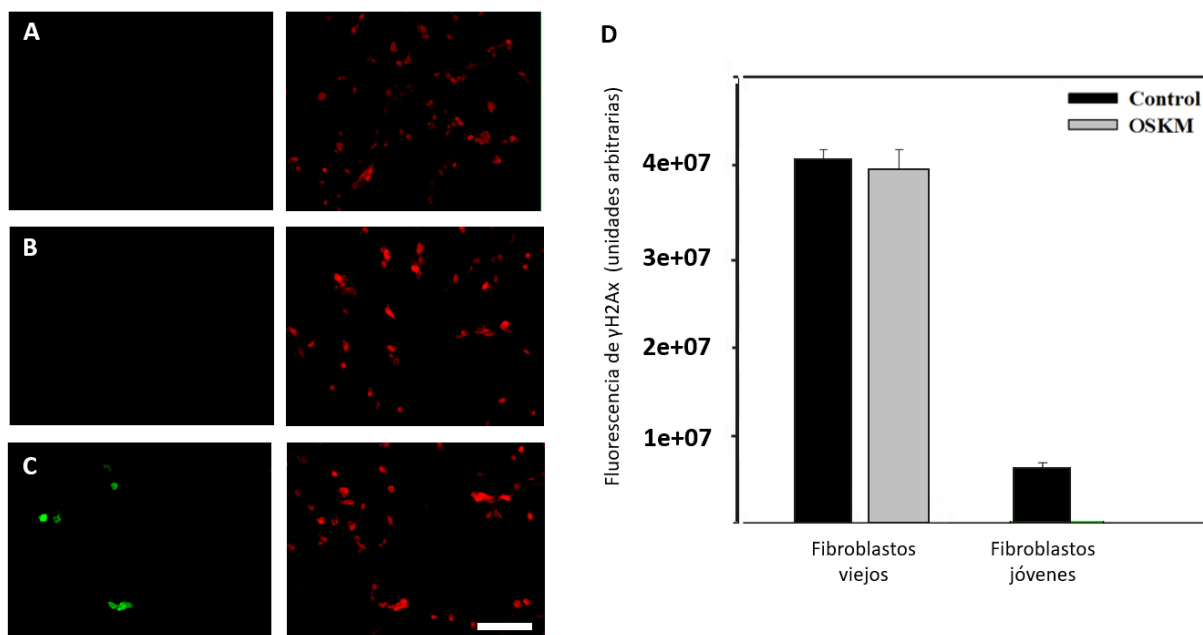


Figura 3.13. Fluorescencia por marcación de γ H2Ax en fibroblastos jóvenes y fibroblastos viejos tratados y sin tratar. La imagen izquierda de cada par corresponde a la fluorescencia verde (GFP) y la derecha a la fluorescencia roja (γ H2Ax). **A)** Fibroblastos jóvenes. **B)** Fibroblastos viejos control. **C)** Fibroblastos viejos tratados con el HD-OSKM. **D)** Intensidad de fluorescencia medida en los tres grupos. No se hallaron diferencias significativas entre los fibroblastos viejos tratados y los viejos control. Escala: 200 μ m.

Para 53BP1, también hubo un poco menos de fluorescencia en los fibroblastos viejos tratados que en los sin tratar. En este caso el efecto del tratamiento debería haber sido un incremento en los niveles de la proteína en cuestión. Sin embargo, la diferencia encontrada tampoco fue estadísticamente significativa ($p=0,134962$) (**Fig. 3.14**).

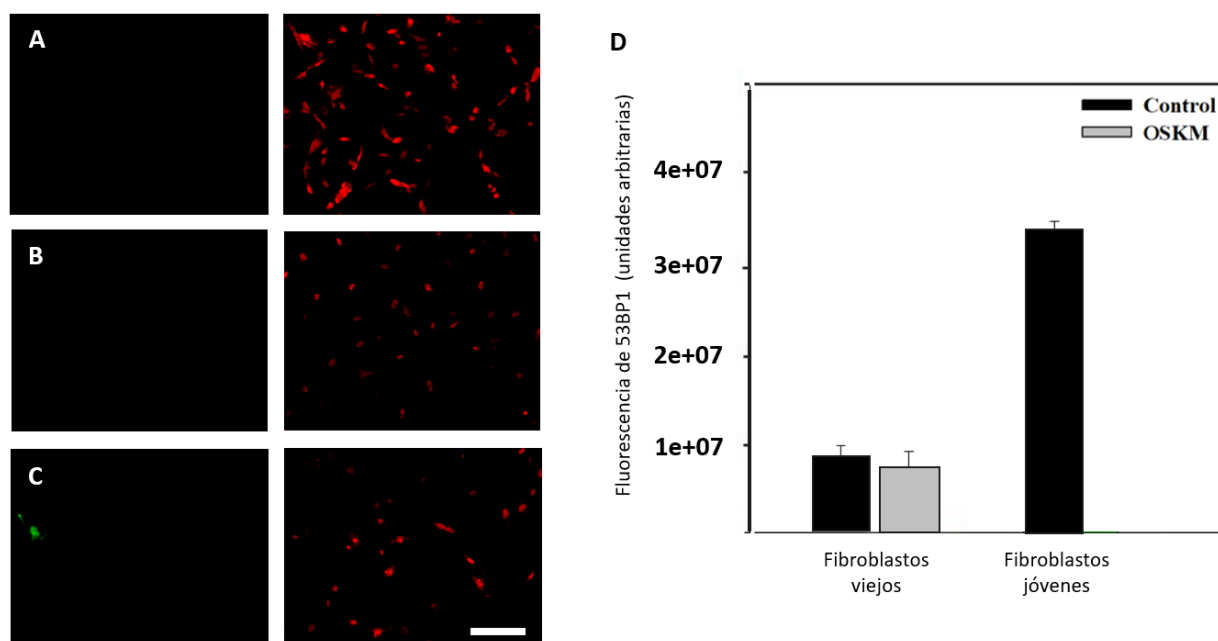


Figura 3.14. Fluorescencia por marcación de 53BP1 en fibroblastos jóvenes y fibroblastos viejos tratados y sin tratar. La imagen izquierda de cada par corresponde a la fluorescencia verde (GFP) y la derecha a la fluorescencia roja (53BP1). **A)** Fibroblastos jóvenes. **B)** Fibroblastos viejos control. **C)** Fibroblastos viejos tratados con el HD-OSKM. **D)** Intensidad de fluorescencia medida en los tres grupos. No se hallaron diferencias significativas entre los fibroblastos viejos tratados y los viejos control. Escala: 200 μ m.

En el caso de LAP2, se vio que la expresión continua de los genes OSKM durante 3 días aumentó el nivel de LAP2 en un 22 %, un aumento significativo ($p=0,0468$) respecto a los fibroblastos viejos sin tratar, los cuales mostraron la disminución esperada relacionada con la edad (**Fig. 3.15**).

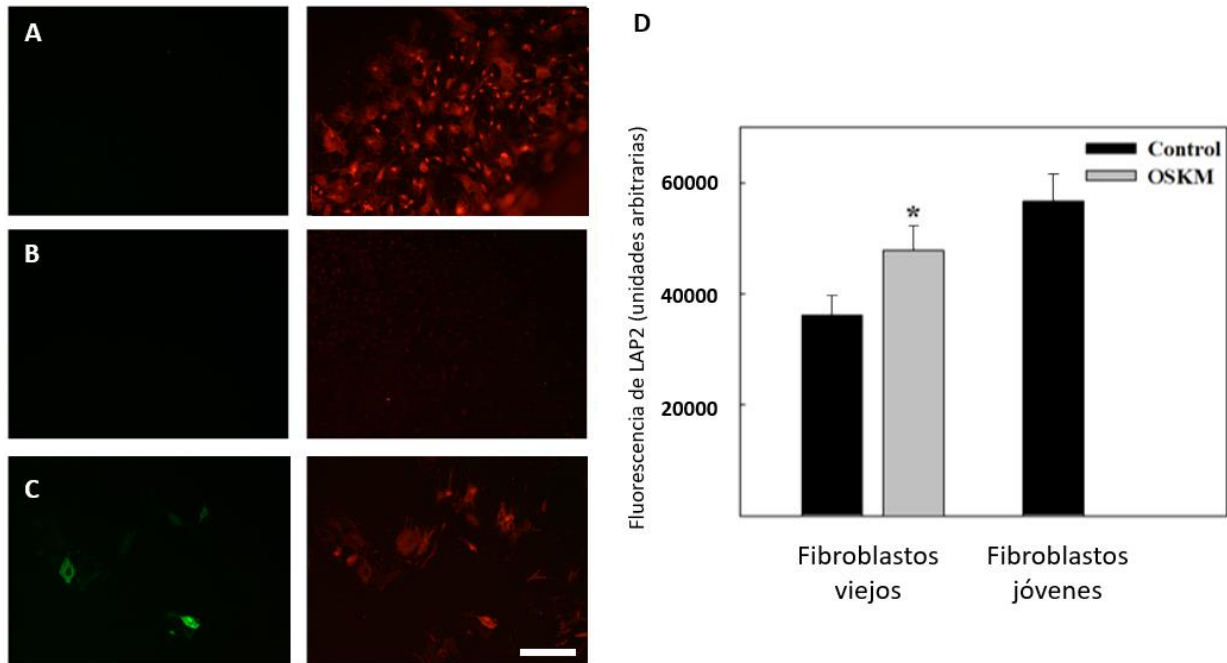


Figura 3.15. Fluorescencia por marcación de LAP2 en fibroblastos jóvenes y fibroblastos viejos tratados y sin tratar. La imagen izquierda de cada par corresponde a la fluorescencia verde (GFP) y la derecha a la fluorescencia roja (LAP2). **A)** Fibroblastos jóvenes. **B)** Fibroblastos viejos control. **C)** Fibroblastos viejos tratados con el HD-OSKM. **D)** Intensidad de fluorescencia medida en los tres grupos. Se encontró una diferencia significativa (* $P<0,05$) entre los fibroblastos viejos tratados y los viejos control. Escala: 200 μm .

3.4 Discusión

La estrategia de reprogramación celular más utilizada es aquella que consiste en convertir una línea celular somática en iPSCs para luego poder diferenciar estas células a un tipo celular específico (Takahashi y Yamanaka, 2006). Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, el proceso es arduo, largo, muy costoso, y probablemente la eficiencia con la que se obtiene el tipo celular de interés sea baja. Todo esto sin mencionar los obstáculos que aparecen a la hora de pensar en una aplicación clínica (Okano *et al.*, 2013). Es por eso que han surgido otras estrategias que implican la conversión directa de un tipo celular a otro, entre ellas la reprogramación directa mediada por factores de pluripotencia, en la cual la reprogramación que se hace es parcial o incompleta. En esta estrategia, las células somáticas se exponen a la expresión transitoria de genes de pluripotencia, dando como resultado intermediarios epigenéticamente inestables (EI) que luego se diferencian a otros tipos celulares mediante cócteles de factores de diferenciación específicos (Kim *et al.*, 2011; Efe *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2013). Aunque se han utilizado vectores adenovirales para hacer reprogramación celular (Zhou y Freed, 2009), hasta el momento en el que generamos nuestro vector no se ha documentado el uso de los mismos para hacer reprogramación celular parcial. Existen estudios hechos en fibroblastos de ratones que tienen los genes OSKM integrados en

su genoma bajo el control de un promotor regulable Tet-On (que funciona de forma inversa a promotor Tet-Off, es decir que el agregado de DOX activa los genes en lugar de reprimirlos) y, en efecto, aunque inicialmente se pensaba que en la reprogramación directa los intermediarios eludían el estado de pluripotencia (Kim *et al.*, 2012), se demostró que por ejemplo, al generar cardiomiocitos (Efe *et al.*, 2011) o precursores neurales (Kim *et al.*, 2011), la mayoría de las células inducidas pasan por un estado de pluripotencia transitorio (Maza *et al.*, 2015). Esta evidencia ha sido reforzada por estudios que muestran que al generar células madre neuronales inducidas (iNSCs) a partir de fibroblastos de ratón, las colonias de iNSCs reprimen los transgenes retrovirales y reactivan los cromosomas X silenciados, ambas marcas características de la pluripotencia (Bar-Nur *et al.*, 2015). Sin embargo, en conjunto, el proceso parece seguro. De hecho, se ha demostrado en estudios *in vivo* que múltiples ciclos de reprogramación parcial en ratones transgénicos que albergan un sistema Tet-On no generan tumores (Ocampo *et al.*, 2016). En nuestro laboratorio, hemos construido un plásmido Tet-On idéntico al Tet-Off descrito, pero no hemos proseguido con la generación del adenovector porque estudios preliminares en cultivo celular han mostrado que el sistema Tet-Off es más adecuado para la reprogramación parcial, que es nuestro objetivo final, principalmente debido al hecho de que el silenciamiento de los genes OSKM es significativamente más rápido en este sistema que en el sistema Tet-On, en el cual la adición de DOX activa rápidamente la expresión transgénica pero la eliminación del antibiótico no lleva a un rápido silenciamiento de la misma. De igual manera, en el sistema Tet-Off después de la eliminación del antibiótico, la DOX unida a la proteína tTA permanece parcialmente protegida del catabolismo normal, lo cual provoca una reactivación lenta de los transgenes silenciados. Una posible manera de evitar este problema es agregar DOX por sólo 1 día y luego eliminarla. Además, aunque incluso en presencia de altas concentraciones de DOX (10 veces más de lo necesario para reprimir el sistema según lo observado en los ensayos *in vitro* realizados para la caracterización del adenovector) nuestro sistema muestra alguna fuga (3,9%), parece poco probable que un nivel de fuga tan bajo sea suficiente para mantener el proceso de reprogramación en marcha. Por estos motivos, optamos por utilizar el sistema Tet-Off en nuestros estudios *in vitro*. Una de las principales limitaciones con las que nos encontramos haciendo uso de este vector es que, si bien es eficaz para transducir fibroblastos de ratas adultas, el hecho de que no integre sus cinco transgenes en el genoma de la célula huésped causa una dilución progresiva en el número de células transducidas a medida que las células del cultivo proliferan. Sin embargo, hemos visto que al menos hasta 5 días después de la transducción, el nivel de expresión de la GFP se mantiene estable.

Podría lograrse, a través de la reprogramación parcial, el rejuvenecimiento epigenético (Manukyan y Singh, 2012), en el cual las células rejuvenecen sin cambiar su tipo celular. Con este marco teórico y los resultados obtenidos en una primera caracterización del adenovector HD-OSKM generado y purificado, hemos determinado que su potencial para realizar reprogramación parcial *in vitro* es bueno, dado que el sistema es seguro al menos cuando se trata de una exposición no prolongada de los genes. De este modo, procedimos a evaluar el efecto de una terapia de 3 días en fibroblastos provenientes de ratas envejecidas, tomando como control los mismos fibroblastos sin recibir tratamiento alguno. Para determinar si las células expuestas al tratamiento con los genes OSKM han sido epigenéticamente

rejuvenecidas, estudiamos cómo dicho tratamiento afectaba los niveles de γ H2AX, 53BP1 y LAP2 en las células. A continuación, discutiremos brevemente la importancia de cada uno de estos marcadores a nivel epigenético.

H2A es una de las proteínas que componen el octámero de histonas en nucleosomas. La importancia de las histonas recae en que las mismas son capaces de interactuar con el ADN en dichas unidades, debido a su carga opuesta. H2AX es una variante de la histona H2A que está involucrada en la reparación del ADN y que conforma el 2 – 25 % del contenido total de dicha histona dependiendo del tipo celular (**Rogakou et al., 1998**). Esta variante está muy conservada en todos los organismos. La diferencia que tiene con la histona original es que contiene, en su extremo C terminal, una serina en el residuo 139, que puede ser fosforilada. γ H2AX es la forma fosforilada de esta proteína, la cual es capaz de marcar las rupturas de doble hebra del ADN – en general a causa de daño UV, estrés metabólico y especies reactivas de oxígeno (ROS) (**Sedelnikova et al., 2002; Redon et al., 2002**) – y de reclutar proteínas para la reparación del mismo. Estas rupturas son una de las lesiones más determinantes en cuanto a muerte celular y preservación de la integridad genómica. γ H2AX es entonces crítica en el sistema de reparación del ADN, teniendo además un rol en la señalización epigenética ya que incrementa la accesibilidad al ADN y facilita el reclutamiento y acumulación de proteínas de respuesta a daño (**Mah et al., 2010**). Esto permite señalar que la reparación del ADN es una asociación íntima entre la maquinaria de reparación y la maquinaria epigenética. De este modo, como parte de la respuesta al daño en el ADN, se ha encontrado una mayor expresión de γ H2AX en células e individuos envejecidos (**McCauley y Dang, 2014**).

53BP1 (del inglés *p53 Binding Protein 1*) es una proteína mediadora que ayuda a activar la vía de reparación del ADN (**Noon y Goodarzi, 2011**). Se ha encontrado en los mismos sitios donde se encuentra γ H2AX, marcando que en dichos sitios ha habido ruptura de doble cadena en el ADN a causa de la exposición a radiación. 53BP1 actúa como un factor de señalización, formando sitios de acumulación de proteínas relacionadas a la reparación del ADN, llamados foci, en una manera dependiente de modificación de histonas (funciona bajo una jerarquía de proteínas que dependen de γ H2AX) (**Panier y Boulton, 2014; Rothkamm et al. 2015**). También es necesaria para reactivar el ciclo celular una vez que los niveles de daño son bajos. El envejecimiento acarrea un déficit en el reclutamiento de 53BP1.

LAP2 (del inglés *lamina-associated polypeptide 2*) es un componente de la lámina nuclear de las células eucariotas. La lámina nuclear es una malla proteica que recubre el lado nucleoplasmático de la membrana nuclear interna (**Somech et al., 2005**). Se sabe que la misma está compuesta de láminas y un número creciente de proteínas de unión a láminas y envolturas nucleares (**Mattout-Drubezki y Gruenbaum, 2003**) y que está involucrada en diversos procesos celulares esenciales tales como el mantenimiento de la morfología nuclear, la organización cromosómica, el control del ciclo celular, la diferenciación y la replicación y transcripción del ADN (**Gruenbaum et al., 2005**). En cuanto a la transcripción, la participación de la lámina nuclear puede verse de dos maneras:

- Mecánica. Las láminas proporcionan sitios de acoplamiento para la cromatina en la periferia nuclear y actúan como plataforma para procesos relacionados con el ADN, como la replicación y la transcripción, las perturbaciones de diversas proteínas de la lámina

provocan una fijación anormal de la cromatina y perturban la transcripción y la replicación (**Favreau et al., 2003; Ognibene et al., 1999; Spann et al., 2002; Spann et al., 1997**).

- Regulatoria. Se ha sugerido que la lámina nuclear tiene un rol principalmente represivo en la regulación transcripcional, dado que existe una correlación entre la cromatina/factores de transcripción localizados periféricamente y la represión de la expresión génica (la heterocromatina, la forma de la cromatina que es transcripcionalmente inactiva, se encuentra preferencialmente cerca de la membrana nuclear) y que además varios componentes de la lámina nuclear interactúan directamente con reguladores transcripcionales específicos o proteínas modificadoras de la cromatina (**Mattout-Drubezki y Gruenbaum, 2003**), entre ellas la familia de proteínas LAP2 (**Nili et al., 2001**). En mamíferos, se conocen 6 proteínas de esta familia. Todas son producto del splicing alternativo del mismo gen (**Nili et al., 2001**) y poseen en su extremo N-terminal un dominio esencial para la unión a una proteína involucrada en la organización de la cromatina.

Se ha encontrado que los niveles de LAP2 disminuyen con el envejecimiento. Se cree que esta disminución se debe a una combinación de factores tales como la disminución de la síntesis de la proteína, el aumento de la degradación de la misma, los cambios en la organización y estructura de la membrana nuclear y mutaciones (**Mounkes y Stewart, 2004; Dornier et al., 2006**) y que podría contribuir a la disfunción celular mediante la pérdida de integridad del núcleo.

Los resultados encontrados a partir de la terapia con el virus portador de los genes de Yamanaka en fibroblastos provenientes de ratas envejecidas fueron favorables sólo con uno de los tres marcadores evaluados: LAP2. En cuanto a las marcas en las que no vimos diferencias significativas en las células tratadas respecto a las células control, en primera instancia se realizaron inmunomarcaciones reveladas con DAB (no incluidas en esta tesis), de modo que la primera hipótesis fue que la técnica elegida para la evaluación de dichas marcaciones no era del todo adecuada (hemos encontrado en bibliografía que H2AX suele cuantificarse mediante inmunofluorescencia (**Mah et al., 2010**)). Por este motivo se repitieron las inmunomarcaciones con una técnica de revelado diferente (ICQ de fluorescencia). Sin embargo, volvimos a obtener resultados negativos. Respecto a γ H2AX en particular, se ha visto que es un marcador que se encuentra en altos niveles en células senescentes, como prueba de que se han puesto en marcha mecanismos de reparación, y que su marca puede persistir aunque el daño haya sido reparado (**Sedelnikova et al., 2004**). Si hablamos de 53BP1, la disminución de sus niveles con la edad se debe a un déficit en su reclutamiento, que probablemente se deba a una regulación epigenética alterada. Este déficit puede afectar la capacidad de las células para reparar el ADN dañado, dado que la ausencia de 53BP1 en algunos sitios de ruptura permite la acumulación ectópica de otra proteína que da lugar a una reparación defectuosa del ADN (**Anglada et al., 2020**), lo cual conlleva a una acumulación de mutaciones y mayor predisposición a enfermedades. Con esta información, junto con el hecho de que los fibroblastos tratados provienen de ratas de edad muy avanzada, y que además podrían tener un envejecimiento propio del cultivo, inferimos que un reinicio en los niveles de estos marcadores sería muy difícil de lograr, aún con estrategias de reprogramación parcial adecuadas. De hecho, en el trabajo de Sinclair en el cual se obtuvieron efectos regenerativos a partir de una terapia con los genes OSK, esta terapia aplicada a ratones muy envejecidos no

logró los mismos resultados (Lu *et al.*, 2020). En cuanto a LAP2, cuya disminución fue revertida significativamente por el tratamiento con nuestro virus, se sabe que su rol en el envejecimiento es complejo y está relacionado mayormente con la organización de la cromatina afectando la replicación y transcripción del ADN. Nuestros resultados muestran un efecto positivo de los genes de pluripotencia, es decir que de alguna forma se está recuperando la represión que se pierde mediante el proceso natural del envejecimiento. Quizás al tener un rol tan complejo, los factores que afectan los niveles de esta proteína son varios, permitiendo que la terapia “ataque” distintos frentes, aumentando así las posibilidades de lograr el efecto deseado.

Nuestro virus también se ha utilizado para transducir fibroblastos humanos, como parte de la tesis de la Dra. Priscila Chiavellini. Los resultados obtenidos en dicha tesis mostraron que el virus es capaz de transducir los fibroblastos humanos con una eficiencia de alrededor de 85 %. La fluorescencia se mantuvo en niveles estables durante 15 días. También se verificó la correcta expresión de los genes OSKM en dichos fibroblastos. A su vez, se realizó un seguimiento de los niveles de ARN mensajero de los genes OSKM y de la GFP. Se verificó, midiendo los niveles de ARN mensajero endógeno para los cuatro genes OSKM, que la expresión de los genes observada realmente correspondiese a la expresión de los transgenes. Se encontró que la sobreexpresión de los genes en fibroblastos humanos durante 9 días no generó pérdida de identidad en las células. A su vez, se intentaron obtener iPSCs por exposición prolongada a los genes, pero los intentos culminaron sin éxito.

Con todo lo discutido previamente y los resultados obtenidos por la Dra. Chiavellini, queda demostrado que se pueden implementar protocolos de reprogramación por sobreexpresión de los genes de manera segura al menos durante 9 días sin que las células pierdan identidad. De este modo, consideramos que nuestro HD-OSKM no es capaz de generar una desdiferenciación completa, lo cual lo convierte en una herramienta apta para implementar la terapia génica *in vivo* a fin de lograr una reprogramación parcial. Nos propusimos entonces como siguiente paso completar la caracterización del modelo biológico disponible en nuestro laboratorio para luego implementar un protocolo de rejuvenecimiento en dicho modelo haciendo uso de nuestro vector.

3.5 Conclusiones

- Se logró generar el vector HD-OSKM.
- Se amplificó y purificó correctamente el vector.
- El HD-OSKM construido expresa tanto los cuatro genes de pluripotencia como la GFP en fibroblastos provenientes de ratas adultas jóvenes, y es correctamente regulado por el agregado de DOX.
- El protocolo de reprogramación directa en fibroblastos provenientes de ratas envejecidas logró restaurar uno de los tres marcadores de envejecimiento evaluados sin generar efectos secundarios.

Capítulo IV: Caracterización del modelo animal

4.1 Objetivo específico

Caracterizar cómo el envejecimiento afecta la memoria de reconocimiento de objetos de las ratas hembra Sprague-Dawley (SD) en la mediana edad y la vejez. Para ello se pondrán a punto dos pruebas comportamentales que permitan evaluar dicha memoria, y se analizarán las estructuras involucradas, el hipocampo y la corteza perirrinal. Esto nos permitirá contar con un modelo de envejecimiento ampliamente caracterizado – la memoria espacial se ha caracterizado en trabajos previos del grupo – al momento de implementar la terapia génica en el hipocampo de los animales.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Animales

Para la puesta a punto de las condiciones se utilizaron ratas hembra SD jóvenes (6 meses; n=18). Para los experimentos de caracterización del modelo de envejecimiento (pruebas cognitivas), se utilizaron ratas hembra SD jóvenes (5 meses; n=24), de mediana edad (18 meses; n=30) y seniles (28 meses; n=26).

Los animales fueron mantenidos en una habitación con temperatura controlada (22 ± 3 °C), con ciclos de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad (luces de 7 am a 7 pm), llevándose a cabo las pruebas siempre durante la fase de luz, con agua y alimento disponibles *ad libitum*. Los protocolos animales fueron éticamente evaluados y aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la FCM, UNLP (P02-0-2017).

4.2.2 Pruebas comportamentales

Las ratas se dividieron en dos grupos experimentales, cada uno con tres grupos etarios (jóvenes, de mediana edad y seniles), y se sometió cada grupo a una prueba comportamental con el objetivo de caracterizar el efecto del envejecimiento sobre la memoria de reconocimiento de objetos, evaluando la localización y las características de los mismos.

Test de reconocimiento espontáneo de la localización del objeto (SLR)

Elección de la distancia mínima para el SLR

Previo a realizar esta prueba, se estableció la distancia mínima que las ratas jóvenes son capaces de discriminar. Para ello, tomamos dos grupos de 4 ratas jóvenes. Todas se familiarizaron con los objetos durante la fase de entrenamiento. Durante la fase de elección evaluamos dos categorías de distancia, para el grupo A de 15 cm y para el grupo B de 20 cm (**Fig. 4.1**). Se escogió la distancia de 20 cm para realizar la prueba.

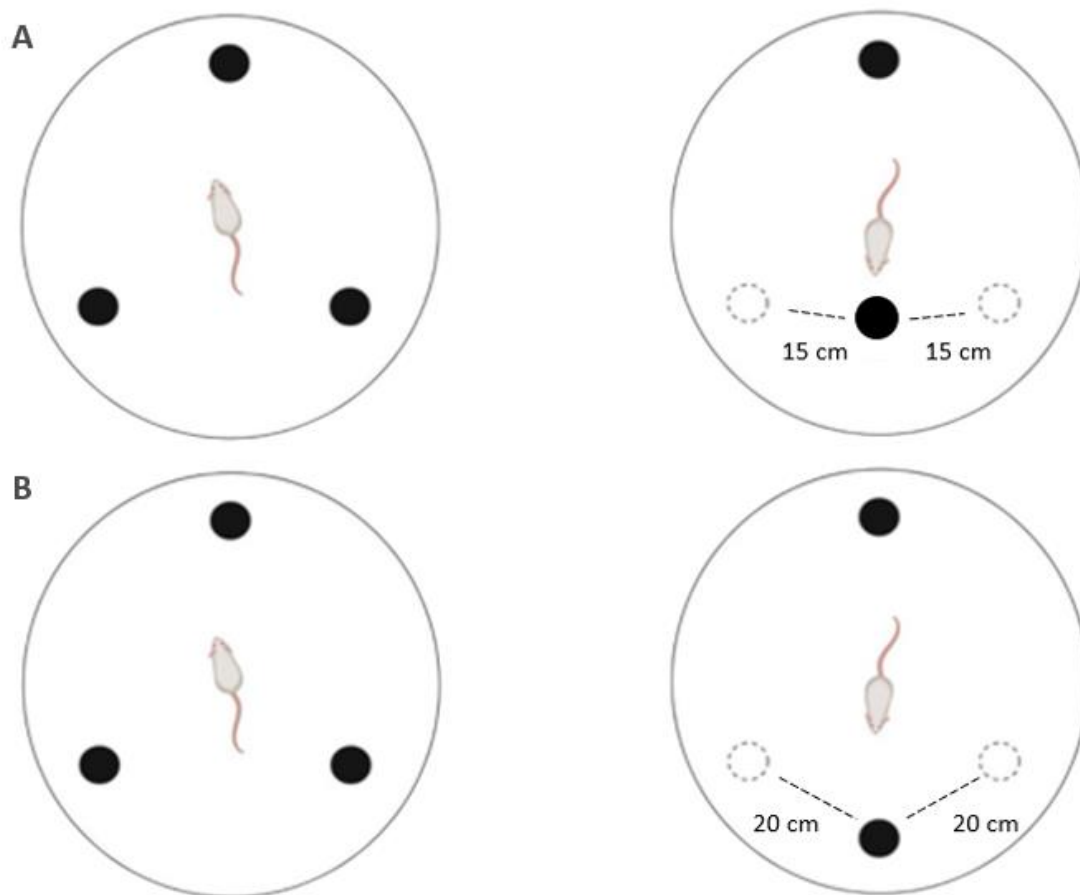


Figura 4.1. Esquema de la disposición de objetos para la elección de la distancia mínima para el SLR. **A)** Distancia de 15 cm. **B)** Distancia de 20 cm.

SLR

Se utilizaron 12 ratas jóvenes, 15 ratas de mediana edad y 13 ratas seniles. La cámara de prueba consiste en un círculo negro de madera (fibrofácil) de densidad media de 90 cm de diámetro por 30 cm de altura.

Los animales fueron manipulados por los mismos operadores durante 3 días antes de realizar la prueba. Al iniciar, los animales fueron trasladados al cuarto de comportamiento y aclimatados durante al menos 1 hora previo a la habituación y prueba. Cada rata fue habituada a la cámara de prueba vacía durante 5 minutos. Se realizó una fase de entrenamiento de 10 minutos seguida de una fase de elección de 5 minutos. Durante la fase de entrenamiento, los animales fueron expuestos a tres objetos idénticos (A1, A2 y A3) ubicados de manera equidistante, a 40 cm entre ellos. Durante la fase de elección, los animales fueron expuestos a dos objetos idénticos (A4 y A5), uno de ellos en una de las posiciones originales (posición familiar) y el otro en una posición novedosa, entre las dos ubicaciones previas restantes (a 20 cm de cada una).

Test de reconocimiento espontáneo de la característica del objeto (SOR)

Elección de condiciones para el SOR

Previo a realizar esta prueba, se probaron dos versiones del mismo: diferente y similar (condiciones de solapamiento bajas versus altas respectivamente). Para ello, tomamos dos grupos de 5 ratas jóvenes. En la versión diferente (solapamiento bajo), los animales se familiarizaron con los objetos A y B durante una fase de entrenamiento. En la fase de elección, se utilizó una copia de A como objeto familiar y se introdujo un objeto C como novedoso. En la versión similar, se les presentó a los animales tres objetos compuestos de dos elementos cada uno (AB, BC y DE), dos de los cuales compartían un elemento (AB y BC). En la fase de elección, se presentó un objeto novedoso compuesto de dos elementos que no estaban combinados en la fase de entrenamiento (AC), y un objeto familiar (DE) (Fig. 4.2). Se escogió la versión similar de la prueba.

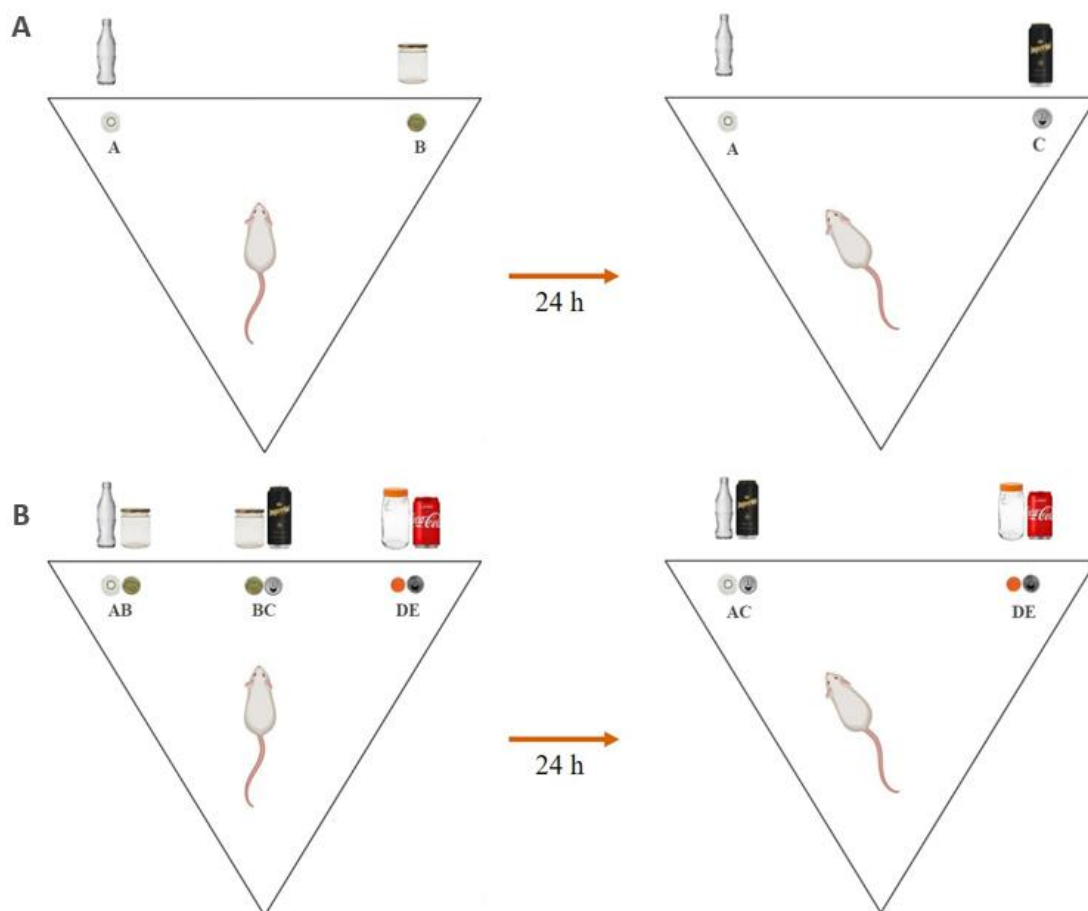


Figura 4.2. Esquema de las versiones analizadas para la elección de las condiciones para el SOR. **A)** Versión diferente (solapamiento bajo). **B)** Versión similar (solapamiento alto).

SOR

Se utilizaron 12 ratas jóvenes, 15 ratas de mediana edad y 13 ratas seniles. La cámara de prueba consiste en un dispositivo triangular de cartón pluma, con cada cara de 60 cm de largo por 70 cm de altura.

Los animales fueron manipulados por los mismos operadores durante 3 días antes de realizar la prueba. Al iniciar, los animales fueron trasladados al cuarto de comportamiento y aclimatados durante al menos 1 hora previo a la habituación y prueba. Cada rata fue habituada a la cámara de prueba vacía durante 5 minutos. Durante la fase de entrenamiento, de 10 minutos, los animales fueron expuestos a tres objetos (AB, BC y DE). En la fase de elección, de 5 minutos, se presentó un objeto novedoso compuesto de dos elementos que no estaban combinados en la fase de entrenamiento (AC), y un objeto familiar (DE).

Tanto en el SLR como en el SOR, la cámara de prueba y los objetos se limpiaron con etanol 10 % entre un animal y el siguiente.

El comportamiento fue grabado con un sistema de videovigilancia y se analizó la frecuencia de interacciones y el tiempo de exploración de cada objeto. Los resultados se expresaron como un índice de discriminación: $(t_{\text{novedoso}} - t_{\text{familiar}})/t_{\text{total}}$, donde t_{novedoso} es el tiempo que las ratas dedicaron a explorar la localización/objeto novedoso, t_{familiar} el tiempo de exploración de la localización/objeto familiar y t_{total} el tiempo total de exploración. Se cuenta como exploración cuando la rata olfatea el objeto o está a menos de 2 cm de distancia del mismo.

4.2.3 Perfusión y procesamiento de los cerebros

Una vez finalizado el experimento, se procedió a la eutanasia de los animales, que fueron colocados bajo anestesia profunda por inhalación de isoflurano y posteriormente perfundidos de manera intracardiaca. Para ello se realizó una incisión a la altura del esternón para poder cortar el diafragma y las costillas en la unión costocondral, de manera de dejar el corazón expuesto. A continuación se canuló la arteria aorta con una aguja de punta roma a través del ventrículo izquierdo y se realizó un corte en la aurícula derecha con el fin de permitir el drenaje del sistema vascular al final del circuito. La perfusión se realizó pasando 200 ml de buffer fosfato (PB) 0,01 M seguidos de 200 ml de paraformaldehído (PFA) al 4 % (pH 7,4 - fijador) mediante una bomba peristáltica (Gilson modelo MP312) a una velocidad de 13 ml/min. Una vez completado el proceso, los animales se decapitaron con guillotina y los cerebros se extrajeron cuidadosamente con alicates. Se almacenaron en PFA al 4 % durante toda la noche a 4 °C. Luego se pasaron a solución criopreservadora (30 % de etilenglicol, 1 % de polivinilpirrolidona, 30 % de sacarosa, en PB 0,1 M, pH 7,4) y se conservaron a - 20 °C hasta que fueron usados para hacer las correspondientes pruebas inmunohistoquímicas. Para ello se enjuagaron de la solución criopreservadora con PB y se cortaron coronalmente en secciones de 40 µm con vibrátomo (VT1000S; Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania/ Leica Microsystems, Heerbrugg, Switzerland). Se dividieron en 6 series, cada serie conteniendo una de cada seis secciones. De esta manera se obtiene un conjunto de secciones seriadas no contiguas que abarcaban el hipocampo dorsal y la corteza perirrinal (con una separación de 240 µm).

4.2.4 Inmunohistoquímica

Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios para las inmunomarcaciones:

- 1) Anticuerpo policlonal de cabra anti-doblecortina (DCX) (marcador de neuroblastos; dilución 1/1000, c-18, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas).

- 2) Anticuerpo monoclonal de ratón anti-NeuN (marcador de núcleos celulares neuronales, dilución 1/500, Millipore, MAB377).
- 3) Anticuerpo policlonal de conejo anti-Iba1 (marcador de microglía, dilución 1/1000, Wako Chemicals, 016-20001, Richmond, VA, USA).

Se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios biotinilados:

- 1) Anticuerpo de caballo anti-cabra (dilución 1/300, Vector Laboratories, BA-9500).
- 2) Anticuerpo de caballo anti-ratón (dilución 1/300, Vector Laboratories, BA-2000).
- 3) Anticuerpo de caballo anti-conejo (dilución 1/300; Vector Laboratories, BA-1100).

Se realizaron las técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) en secciones de flotación libre. Para cada animal se procesaron conjuntos separados de secciones. Se inhibió la peroxidasa endógena con H₂O₂ 3 % durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se procedió al bloqueo de uniones inespecíficas con suero normal de caballo (SNC) 10 % disuelto en solución de lavado (PB 0,01 M, tritón 0,03 %) durante 1 h a temperatura ambiente. Se incubó durante toda la noche con el anticuerpo primario a 4 °C, y luego con el anticuerpo secundario, según corresponda, durante 120 min. Luego se incubó con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (kit ABC, dilución 1/500, Vector Laboratories, PK-6100) durante 90 min y, por último, con la solución de revelado, empleando 3,3-diamino bencidina tetrahidro-cloruro (DAB) como cromógeno (DAB + H₂O₂ al 0,003 % en PB), durante 5 min. Luego de cada paso se realizaron tres lavados de 5 minutos con solución de lavado. Tanto los anticuerpos primarios y secundarios como el complejo se diluyeron en solución de lavado SNC 3 %. Las secciones se colorearon con la tinción Nissl (solución de violeta de cresilo al 0,5 % a 37 °C durante 15 segundos) para visualizar los puntos de referencia anatómicos. Finalmente, se deshidrataron y se montaron con Bálsamo de Canadá (Biopack).

4.2.5 Obtención y análisis de imágenes

Centramos nuestro análisis en el hipocampo dorsal y en la corteza perirrinal (PRh). Analizamos DCX, NeuN e Iba-1 en el hipocampo de las ratas para establecer una relación entre esta zona del cerebro y el desempeño cognitivo de las ratas en el SLR. Por otro lado, analizamos NeuN e Iba-1 en la PRh de las ratas con el fin de relacionar los cambios observados en esta zona con el desempeño de las ratas en el SOR. Para la toma de imágenes se utilizó un microscopio Olympus BX-51 conectado a una cámara de video Olympus DP70 CCD (Tokio, Japón). El número total de células se estimó usando una versión modificada del método del disector óptico (**West, 1993 a**). Las estimaciones individuales del número total de células bilaterales (N) se calcularon de acuerdo con la siguiente fórmula: $N = RQ\Sigma * 1 / ssf * 1 / asf * 1 / tsf$, donde RQΣ es la suma de las células contadas, ssf es la fracción de muestreo de la sección, asf es la fracción de muestreo del área y tsf es la fracción de muestreo del espesor. En todos los casos, para el análisis de las imágenes se utilizó el programa ImageProPlus v5.1 (IPP, Media Cybernetics).

Análisis de neuroblastos

Como se mencionó anteriormente, los neuroblastos se detectaron mediante inmunohistoquímica para DCX en el hipocampo de las ratas. El número de células positivas para DCX se evaluó mediante la técnica de fraccionador óptico modificada (**West, 1993 a**).

Debido a que el número de neuronas inmaduras en las ratas seniles no es muy alto, se cuantificaron todas las regiones de la zona subgranular (SGZ) y de la capa celular granular (GCL). Las estimaciones se basan en el conteo de cuerpos celulares DCX inmunorreactivos (DCXir) en cada uno de los campos fotografiados (constituidos por dos imágenes a distinto foco). También evaluamos el diámetro de las células DCXir haciendo uso de la herramienta de medición manual del IPP, con las imágenes debidamente calibradas.

Análisis de neuronas maduras

Las neuronas maduras fueron detectadas como células NeuN inmunorreactivas (NeuNir) en dos zonas del hipocampo – giro dentado (DG) y *Stratum pyramidale* (Spy) de la región CA3 – y en la PRh. Con el fin de analizar una posible neurodegeneración, se determinó el área inmunorreactiva (IRA) para NeuN (**Zappa Villar et al., 2018**). Se utilizó el software ImageProPlus v5.1 (IPP, Media Cybernetics). Para cada dato de área, se determinó el fondo de las imágenes ajustando manualmente la ventana de densidad del sistema (**West, 1993 a**), hasta que solo se seleccionaron las neuronas NeuNir.

Análisis de células de la microglía

Las células microgliales se identificaron como células inmunorreactivas Iba-1 (Iba-1ir). Las células Iba-1ir se contaron en dos regiones del hipocampo – el *Dentate hilus* (Dh) y *Stratum lucidum* (Sl) – y en la PRh. El número de células Iba-1ir se estimó mediante una versión modificada del método del disector óptico (**Zappa Villar et al., 2018**). En todas las regiones analizadas se utilizó una cuadrícula (área = 22500 μm^2) sobre las imágenes calibradas. Se utilizaron las líneas de arriba y de la derecha como límites de inclusión (las células en contacto con dichas líneas se incluyen en el recuento) y las líneas de abajo y de la izquierda como límites de exclusión. Para determinar si existía un fenotipo neuroinflamatorio se clasificaron morfológicamente las células Iba-1(+) como células de tipo I, II, III, IV y V (**Diz-Chaves et al., 2013**). Las células de tipo I, II y III pertenecen a la categoría de microglía no reactiva, mientras que las de tipo IV y V se tomaron como microglía reactiva (Tipo I: células con pocos procesos celulares (≤ 2); Tipo II: células con tres a cinco ramas cortas; Tipo III: células con procesos celulares más largos y numerosos (> 5) y un cuerpo celular pequeño; Tipo IV: células con somas grandes y procesos retraídos y más gruesos; Tipo V: células con cuerpo celular ameboide, numerosos procesos cortos e inmunomarcación Iba-1 intensa).

4.2.6 Análisis estadístico

Los datos comportamentales se compilaron y analizaron con el software Sigma Plot v. 11 (San Jose, CA). Se utilizaron mediciones repetidas bidireccionales de ANOVA (Factores edad y objeto como variables independientes) para determinar la preferencia de los objetos en la fase de entrenamiento según la edad. Para la fase de elección, se utilizó el ANOVA de una vía para comparaciones grupales (factor edad como variable independiente) y el t-test de una muestra para evaluar la capacidad de discriminación considerando que la diferencia entre la media de la población muestreada y la media poblacional hipotética es igual a cero (0).

Los datos estereológicos se analizaron con ANOVA de una vía (factor edad como variable independiente).

En el caso de que los datos no superasen el criterio de normalidad o igual variante, se realizó Kruskal-Wallis. Se emplearon pruebas post-hoc cuando fue apropiado (Holm-Sidak y Dunn). La correlación de orden de rango de Spearman se utilizó para correlacionar los cambios en el cerebro con la memoria de los animales. Todos los datos se presentan como media \pm SEM. Los criterios para las diferencias significativas se fijaron en el nivel de probabilidad del 95 %.

4.3 Resultados

4.3.1 Pruebas comportamentales

Test de reconocimiento espontáneo de la localización del objeto (SLR)

Elección de la distancia mínima para el SLR

Ambos grupos (A y B) exploraron por igual los tres objetos durante la fase de entrenamiento (mediciones repetidas de ANOVA de una vía; Grupo A: $F(2,6) = 0,70$, $P = 0,53$; Grupo B: $F(2,6) = 1,66$, $P = 0,27$). Durante la fase de elección, la preferencia por el objeto desplazado aumentó en función de la categoría de distancia (t-test de una muestra; Grupo A: $T(6) = 0,80$, $P = 0,45$; Grupo B: $T(6) = -3.37$, $P = 0,015$) (**Fig. 4.3**), de modo que se escogió la distancia de 20 cm para realizar la prueba.

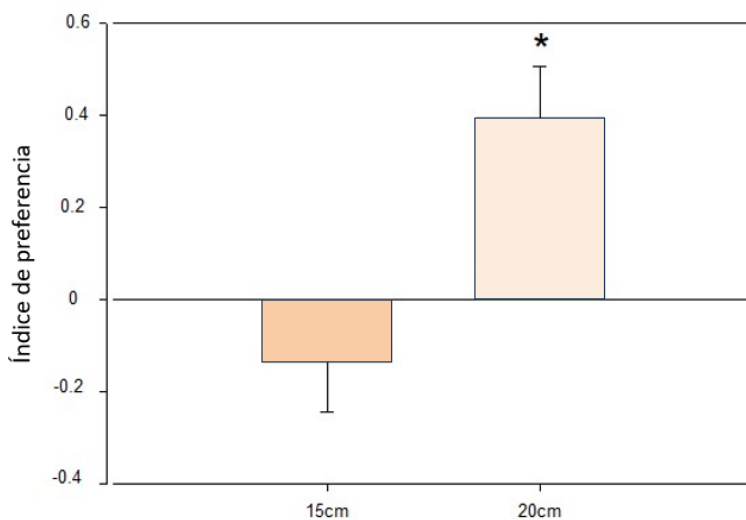


Figura 4.3. Elección de la distancia mínima para el SLR. Las barras representan la preferencia por la localización novedosa frente a la familiar en la fase de elección. Se observa que la preferencia por la localización novedosa aumenta en función de la categoría de distancia.

SLR

Se analizó el tiempo que dedicaron las ratas a explorar cada objeto en la fase de entrenamiento. No se observaron diferencias significativas en la exploración de cada objeto entre los distintos grupos (Medidas repetidas de ANOVA de dos vías: Factor edad: $F(2, 76) = 3,2$ e-15; $P = 1$; Factor objeto: $F(2, 76) = 0,32$; $P = 0,72$; Factor edad x objeto: $F(4, 76) = 1,82$; $P = 0,13$) (**Fig. 4.4 B**), de modo que las diferencias en el índice de discriminación no pueden explicarse por la exploración preferente de ninguno de los objetos durante esta fase. Para la fase de elección, expresamos nuestros resultados como un índice de discriminación $[(t_{\text{novedoso}} - t_{\text{familiar}})/t_{\text{total}}]$. La capacidad de discriminación se redujo significativamente con la edad (ANOVA de una vía: $F(2, 39) = 3,85$; $P = 0,03$). Las comparaciones post-hoc revelaron un déficit

significativo en el rendimiento de las ratas de mediana edad, que se mantiene en las ratas seniles (método Holm-Sidak; $P < 0,05$) (**Fig. 4.4 C**). Mediante t-test de una muestra observamos que sólo los animales jóvenes fueron capaces de discriminar la ubicación novedosa ($T(11) = 2,67$; $P = 0,02$), mientras que los índices de discriminación de los animales pertenecientes a los grupos de mayor edad no fueron diferentes de cero ($T(14) = -0,07$; $P = 0,94$, y $T(12) = 0,10$; $P = 0,92$, respectivamente). Además, medimos la actividad exploratoria total durante las fases de entrenamiento y elección en todos los grupos etarios y no encontramos diferencias significativas entre los mismos (**Tabla 1**).

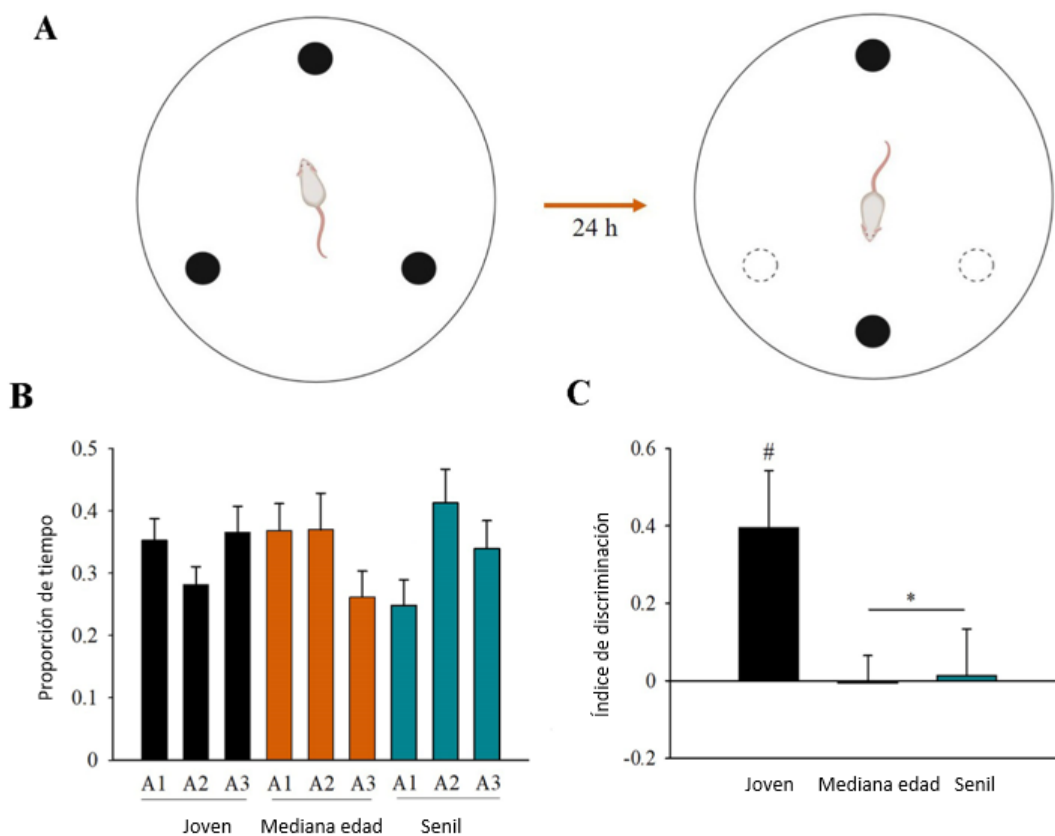


Figura 4.4. Test de reconocimiento espontáneo de la localización del objeto (SLR). **A)** Representación esquemática de la prueba. **B)** Tiempo proporcional de exploración para cada una de las localizaciones (A1, A2 y A3) en la fase de entrenamiento del SLR. **C)** Índice de discriminación de la localización novedosa versus la localización familiar durante la fase de elección. Los datos están expresados como el promedio \pm SEM. Los índices de discriminación se consideraron estadísticamente diferentes con * $P < 0.05$ comparando con el grupo joven (Holm-Sidak post-hoc test) y # $P < 0.05$ comparando a cero (t-test de una muestra).

Test de reconocimiento espontáneo de la característica del objeto (SOR)

Elección de condiciones para el SOR

En ambas condiciones – diferente y similar – se mantuvo intacta la discriminación de objetos (Grupo A: t-test de una muestra $T = 6,01$ (5), $P = 0,002$; Grupo B: $T = 13,12$ (2), $P = 0,006$). Como ambas versiones mostraron buenos resultados, se escogió la versión similar (solapamiento alto) para realizar la prueba.

SOR

Los parámetros evaluados fueron los mismos que en el SLR. No encontramos diferencias significativas en la exploración de muestras entre los grupos (ANOVA de medidas repetidas de dos vías: factor Edad: $F(2,76) = 1,65$; $P = 1$), pero sí hubo una frecuencia de exploración diferente entre los objetos (ANOVA de medidas repetidas de dos vías: factor Objeto: $F(2, 76) = 20,25$; $P < 0,001$), así como una interacción entre la edad y el objeto (ANOVA de medidas repetidas de dos vías: factor Edad x Objeto: $F(4, 76) = 3,14$; $P = 0,02$). Las comparaciones post-hoc revelaron que las ratas jóvenes y de mediana edad mostraban la misma preferencia por los objetos AB y DE, pero una preferencia menor por el objeto BC. Las ratas seniles presentaron igual preferencia por los objetos AB y BC, pero una preferencia mayor por el objeto DE (método Holm-Sidak; $P < 0,05$) (**Fig. 4.5 B**). En la fase de elección encontramos que el rendimiento de las ratas se veía significativamente afectado por la edad (ANOVA de una vía: $F(2, 36) = 13,79$; $P < 0,001$). Las comparaciones post-hoc realizadas mostraron diferencias estadísticamente significativas entre las ratas jóvenes y seniles ($T = 5,09$; $P < 0,001$) y entre las ratas de mediana edad y seniles ($T = 3,75$; $P < 0,001$), pero no entre las ratas jóvenes y de mediana edad (test de Holm Sidak: $T = 1,59$; $P = 0,12$) (**Fig. 4.5 C**). Mediante t-test de una muestra se observó que sólo los animales jóvenes fueron capaces de discriminar el objeto novedoso ($T(12) = 3,16$; $P = 0,008$), mientras que la tasa de discriminación de los animales de mediana edad no fue diferente de cero ($T(15) = 1,51$; $P = 0,18$), y los animales seniles discriminaron negativamente el objeto novedoso ($T(12) = -3,44$; $P = 0,005$). Además, medimos la actividad exploratoria total durante las fases de entrenamiento y elección y no encontramos diferencias significativas entre los grupos (**Tabla 1**).

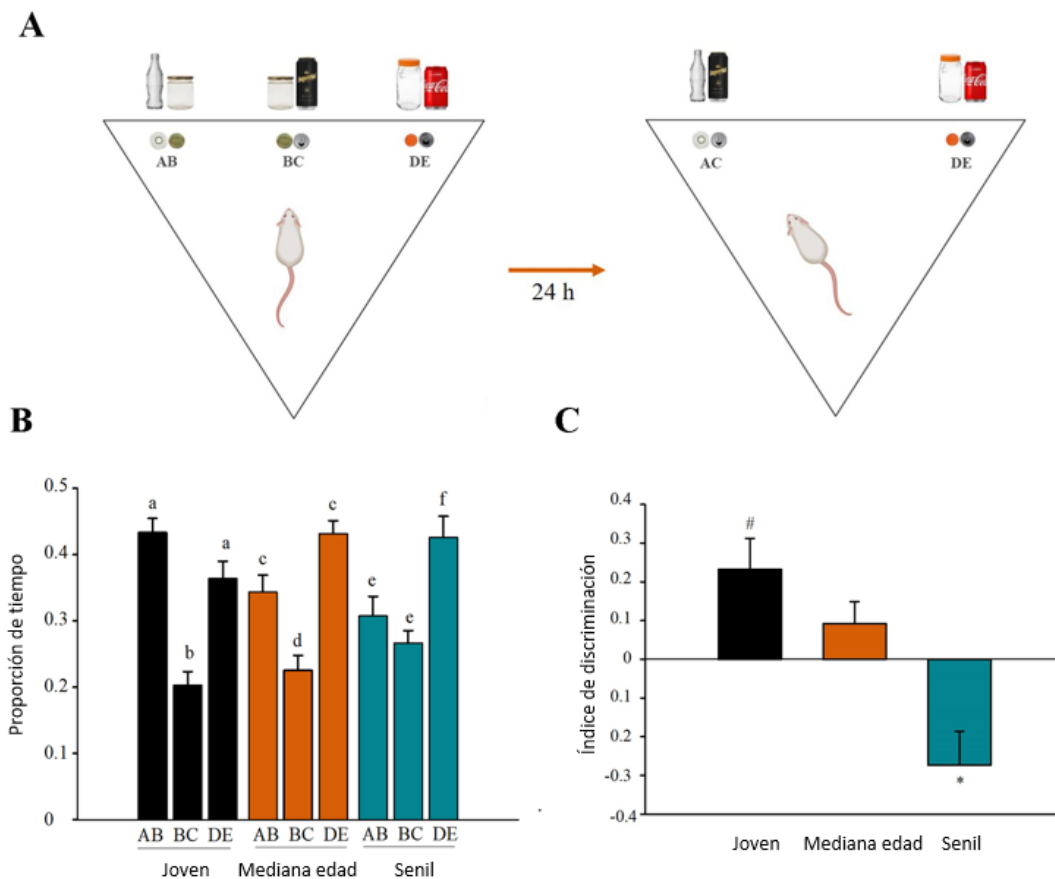


Figura 4.5. Test de reconocimiento espontáneo de la característica del objeto (SOR). **A)** Representación esquemática de la prueba. **B)** Tiempo proporcional de exploración para cada uno de los objetos (AB, BC y DE) en la fase de entrenamiento del SOR. **C)** Índice de discriminación del objeto novedoso versus el objeto familiar durante la fase de elección. Los datos están expresados como el promedio \pm SEM. Igual preferencia por determinado objeto se representa con la misma letra (a, c y e), mientras que una diferencia preferencial se representa con una letra distinta (b, d y f). Los índices de discriminación se consideraron estadísticamente diferentes con * $P < 0.05$ comparando con el grupo joven (Holm-Sidak post-hoc test) y # $P < 0.05$ comparando a cero (One-sample t-test).

	Jóvenes	Mediana edad	Seniles	ANOVA
SLR-entrenam	43,91 \pm 7,43 (N = 12)	44,73 \pm 6,27 (N = 15)	54,07 \pm 7,11 (N = 13)	H(2)=1,6 P =0,44
SLR-elección	19,5 \pm 4,77 (N = 12)	18,46 \pm 3,24 (N = 15)	24,23 \pm 3,77 (N = 13)	H(2)=1,84 P=0,39
SOR-entrenam	76,69 \pm 14,37 (N = 12)	82,57 \pm 14,69 (N = 15)	99,85 \pm 12,81 (N = 13)	F(2,38)=0,74 P=0,48
SOR-elección	39,46 \pm 7,74 (N=12)	42,5 \pm 4,98 (N=15)	49,69 \pm 7,17 (N=13)	F(2,39)=0,604 P=0,55

Tabla 1. Tiempo total de exploración en las distintas fases del SLR y SOR en segundos (promedio \pm SEM) para cada grupo etario.

4.3.2 Análisis de imágenes

Análisis de neuroblastos

Se encontraron diferencias en los valores medios correspondientes a la cantidad de células DCXir entre los distintos grupos etarios (Kruskal-Wallis ANOVA de una vía sobre rangos: $H(2,12) = 9,5$; $P = 0,009$). La comparación post-hoc reveló una disminución de la población de neuronas DCXir en los grupos de mayor edad comparados con las ratas del grupo joven (método de Dunn: $P < 0,05$) (**Fig. 4.6 D**). A su vez se evaluó el diámetro de las células DCXir, que también se vio afectado por el factor edad (ANOVA de una vía: $F(2,12) = 8,67$; $P = 0,005$). La comparación post-hoc mostró una reducción del diámetro medio en las cohortes de mayor edad en comparación con sus homólogos jóvenes (método Holm-Sidak: $P < 0,05$) (**Fig. 4.6 D, recuadro**).

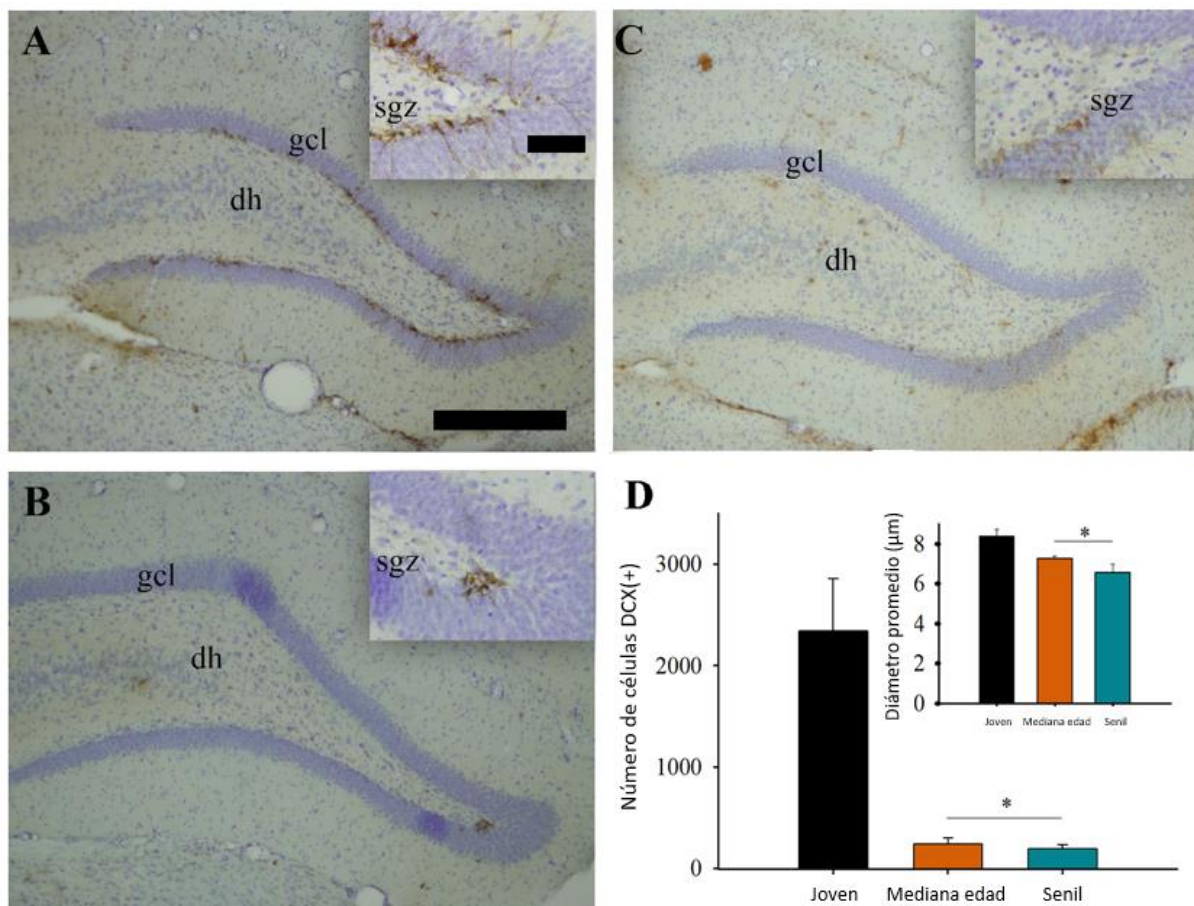


Figura 4.6. Número y diámetro promedio de neuroblastos en el giro dentado. (**A – C**) Secciones coronales en representación de cada grupo etario de animales. Las células teñidas de color marrón son las células DCX(+). La coloración lila corresponde a la tinción con Nissl. **A)** Grupo joven. **B)** Grupo de mediana edad. **C)** Grupo senil. Escala: 200 µm en las imágenes panorámicas, 50 µm en los recuadros. **D)** Número de células DCX(+). Recuadro: Diámetro promedio de células DCX(+). Los datos están expresados como promedio \pm SEM. Abreviaciones: dh (*dentate hilus*); gcl (*granular cell layer*); sgz (*subgranular zone*). Se consideró que las diferencias fueron estadísticamente significativas cuando * $P < 0.05$ respecto al grupo joven.

Análisis de neuronas maduras

Se midió el área inmunorreactiva de NeuN en el DG, en el *stratum pyramidale* (spy) de la región CA3 y en la PRh, obteniendo diferencias significativas entre los grupos de mayor edad

comparados con las ratas del grupo joven sólo en la región CA3 (**Fig. 4.7 D; Tabla 2;** factor F del grupo ANOVA de una vía (2, 13) = 9,38; P = 0,008). Las comparaciones post-hoc mostraron una reducción significativa de aproximadamente 18 % en las ratas de mediana edad y 12 % en las ratas seniles en comparación con las ratas jóvenes (método Holm-Sidak: T = 4,13; P = 0,003 y T = 3,06; P = 0,016 para mediana edad y seniles, respectivamente).

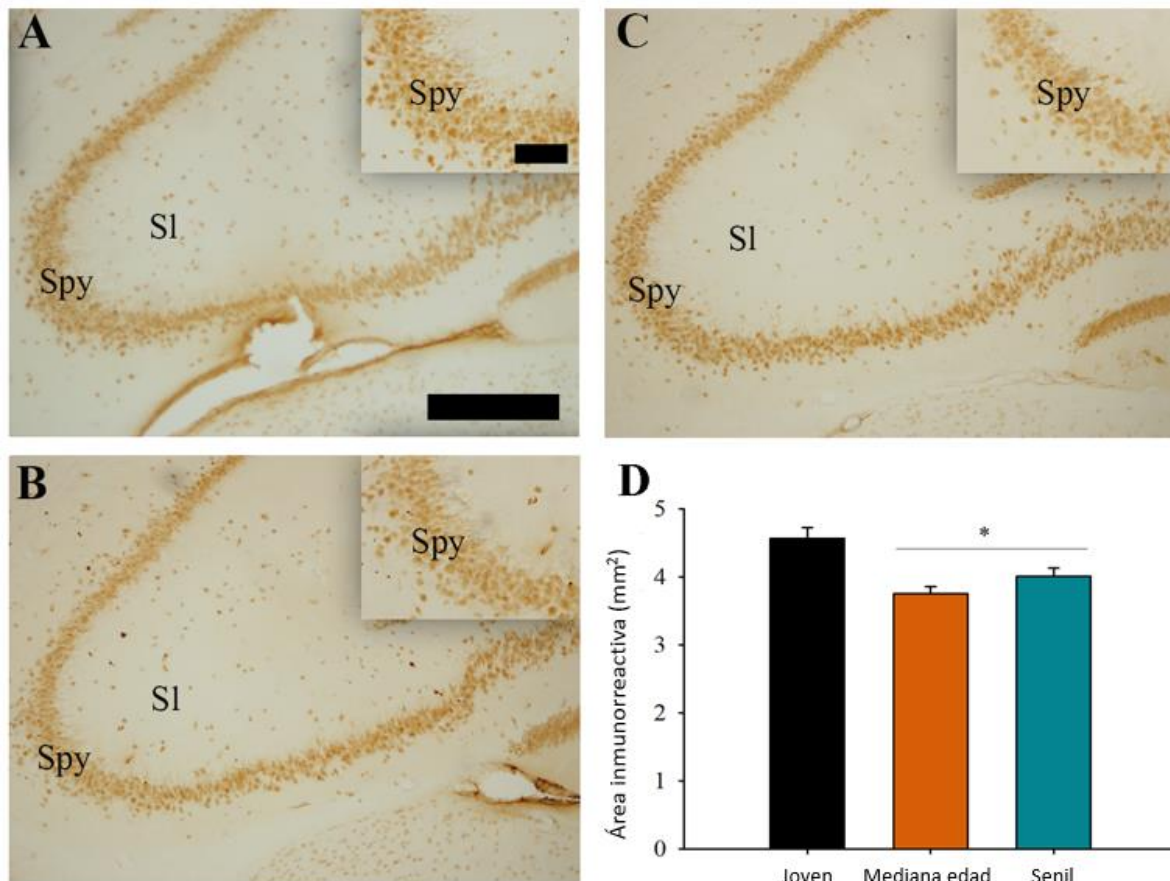


Figura 4.7. Área inmunorreactiva de NeuN en la región CA3. **(A – C)** Secciones coronales en representación de cada grupo etario de animales. Las células teñidas de color marrón son las células NeuN(+). **A)** Grupo joven. **B)** Grupo de mediana edad. **C)** Grupo senil. Escala: 200 μ m en las imágenes panorámicas, 50 μ m en los recuadros. **D)** Área inmunorreactiva de NeuN. Los datos están expresados como promedio \pm SEM. Abreviaciones: Spy (*stratum pyramidale*); SI (*stratum lucidum*). Se consideró que las diferencias fueron estadísticamente significativas cuando * $P < 0.05$ respecto al grupo joven.

	DG	CA3	PRh
Jóvenes	7 \pm 0,47 (N = 4)	4,56 \pm 0,15 (N = 4)	3,01 \pm 0,12 (N = 4)
Mediana edad	7,19 \pm 0,03 (N = 3)	3,74 \pm 0,10 (N = 3)	2,65 \pm 0,33 (N = 3)
Seniles	6,61 \pm 0,29 (N = 4)	4 \pm 0,12 (N = 4)	2,84 \pm 0,09 (N = 4)

Tabla 2. Área inmunorreactiva de NeuN en DG, CA3 y PRh en mm^2 (promedio \pm SEM) para cada grupo etario.

Análisis de células de la microglía

Se encontraron cambios significativos entre los grupos en el número total de células microgliales en la región DG-CA3 del hipocampo, así como en la PRh (factor de grupo ANOVA de una vía para DG: $F(2, 11) = 8$; $P = 0,001$; para CA3: $F(2, 11) = 16,22$; $P = 0,001$; y para PRh: Kruskal-Wallis ANOVA de una vía en rangos: $H(2, 7) = 6,3$; $P = 0,023$). En CA3, la cuantificación mostró un aumento de alrededor del 25 % en el número de células microgliales sólo en ratas seniles (**Fig. 4.8 D; Tabla 3**). En DG, por el contrario, la cuantificación revela una reducción de alrededor del 25 % en el número de toda la población de células microgliales sólo en ratas seniles (**Fig. 4.9; Tabla 3**). En PRh, la disminución del número de células de la microglía afecta a las ratas de mediana edad (alrededor del 20 %) y muestra una caída más precipitada en ratas seniles, alcanzando alrededor del 30 % (**Fig. 4.10 D; Tabla 3**). Las células microgliales se clasificaron en reactivas y no reactivas. No encontramos diferencias significativas entre los grupos en el número de células reactivas en DG (factor de grupo ANOVA unidireccional $F(2, 11) = 0,76$; $P = 0,5$) o en PRh (factor de grupo ANOVA unidireccional $F(2, 14) = 0,31$; $P = 0,74$). Sin embargo, sí encontramos diferencias significativas en el Stratum lucidum (Sl) de la región CA3 (factor de grupo ANOVA unidireccional $F(2, 11) = 5,93$; $P = 0,023$). Más allá del aumento significativo en el número de células microgliales reactivas en la región CA3 de las ratas seniles (**Fig. 4.8 D**), la relación entre microglía reactiva y total no muestra cambios en estas ratas, comparando con las ratas jóvenes (**Tabla 3**).

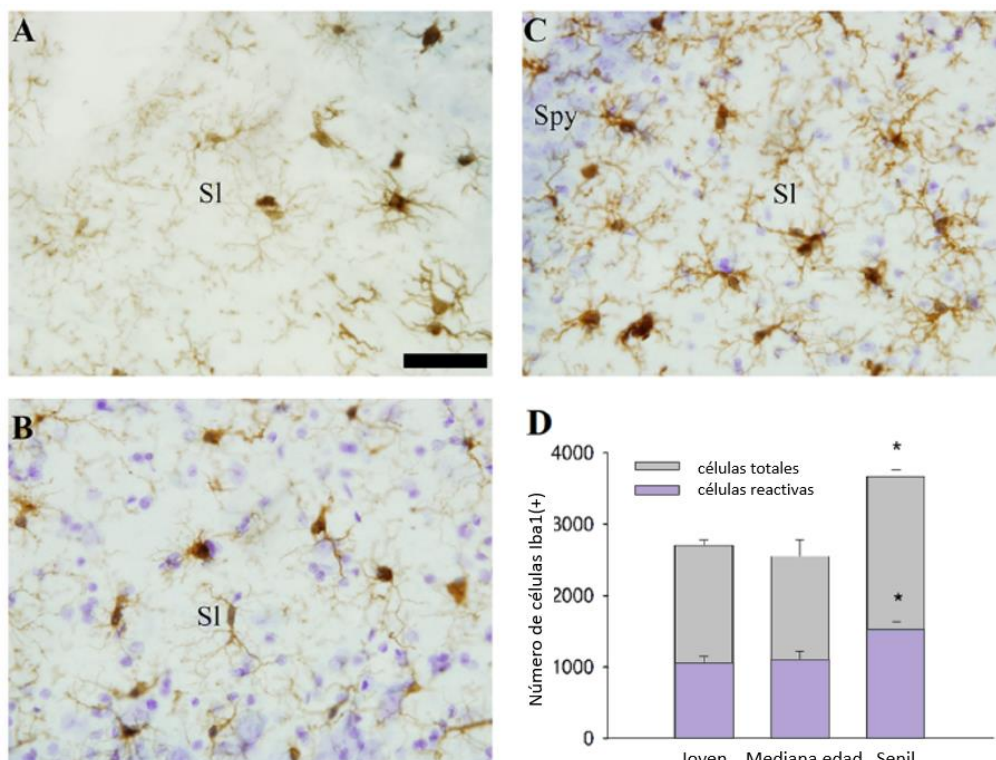


Figura 4.8. Número de células de la microglía en la región CA3. **(A – C)** Secciones coronales en representación de cada grupo etario de animales. Las células teñidas de color marrón son las células Iba1(+). **A)** Grupo joven. **B)** Grupo de mediana edad. **C)** Grupo senil. Escala: 50 μ m. **D)** Número de células Iba1(+) en CA3. Los datos están expresados como promedio \pm SEM. Abreviaciones: Spy (*stratum pyramidale*); Sl (*stratum lucidum*). Las barras grises representan la microglía total, mientras que las barras lilas representan la microglía reactiva. Se consideró que las diferencias fueron estadísticamente significativas cuando * $P < 0.05$ respecto al grupo joven.

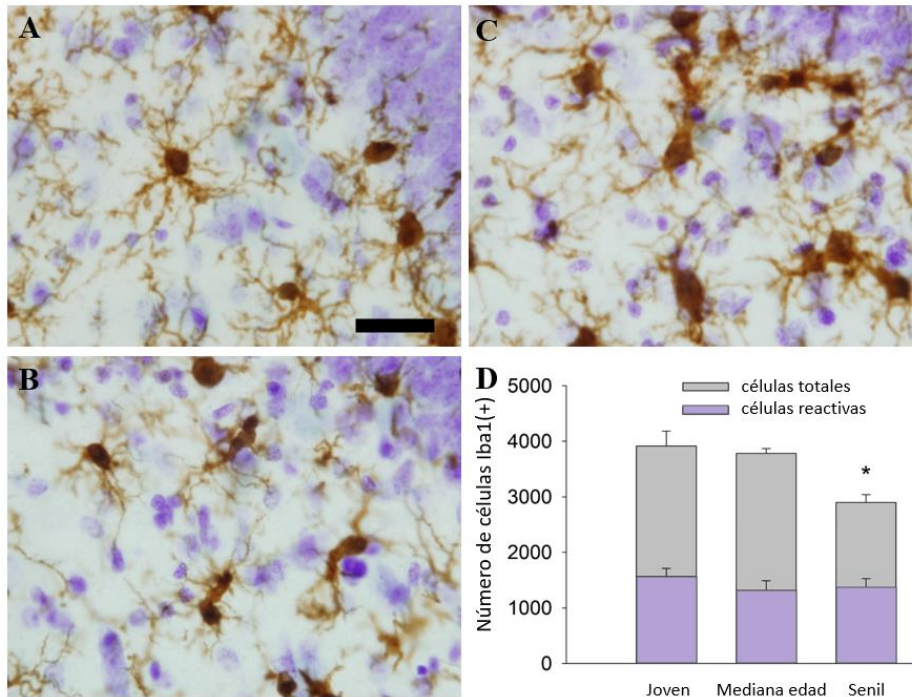


Figura 4.9. Número de células de la microglía en el DG. **(A – C)** Secciones coronales en representación de cada grupo etario de animales. Las células teñidas de color marrón son las células Iba1(+). **A)** Grupo joven. **B)** Grupo de mediana edad. **C)** Grupo senil. Escala: 30 μ m. **D)** Número de células Iba1(+) en DG. Los datos están expresados como promedio \pm SEM. Las barras grises representan la microglía total, mientras que las barras lilas representan la microglía reactiva. Se consideró que las diferencias fueron estadísticamente significativas cuando * $P < 0.05$ respecto al grupo joven.

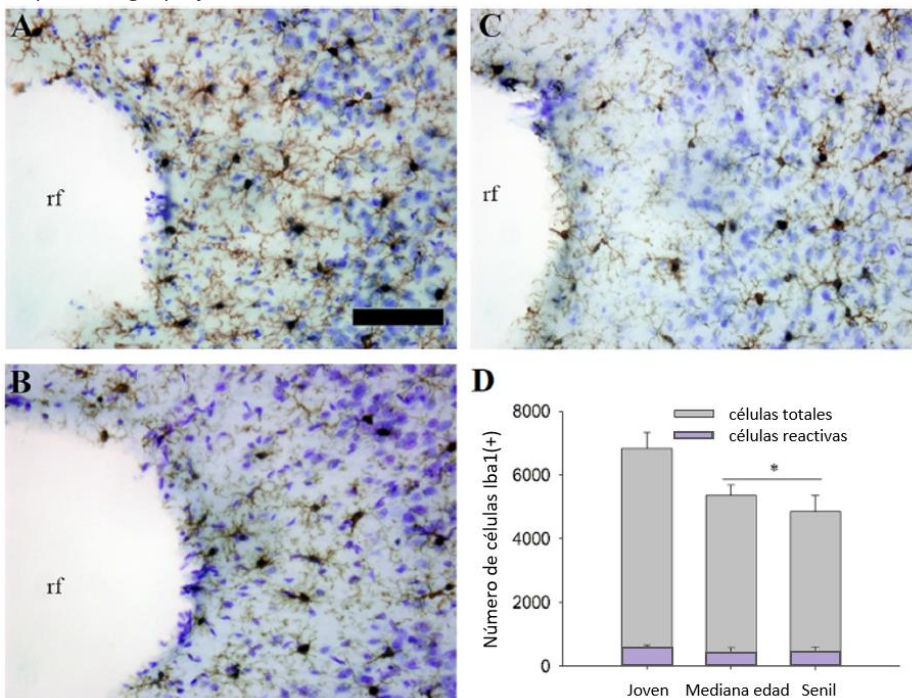


Figura 4.10. Número de células de la microglía en la PRh. **(A – C)** Secciones coronales en representación de cada grupo etario de animales. Las células teñidas de color marrón son las células Iba1(+). **A)** Grupo joven. **B)** Grupo de mediana edad. **C)** Grupo senil. Escala: 100 μ m. **D)** Número de células Iba1(+) en la PRh. Los datos están expresados como promedio \pm SEM. Abreviaciones: rf (*rhinal fissure*). Las barras grises representan la microglía total, mientras que las barras lilas representan la microglía reactiva. Se consideró que las diferencias fueron estadísticamente significativas cuando * $P < 0.05$ respecto al grupo joven.

	DG	CA3	PRh
Jóvenes	3912 ± 272	2704 ± 78	6830 ± 497
	1566 ± 146	1054 ± 88	548 ± 120
	0,40 (N=4)	0,38 (N=4)	0,08 (N=4)
Mediana edad	3783 ± 88	2550 ± 229	5361 ± 323
	1314 ± 175	1093 ± 126	333 ± 136
	0,36 (N=4)	0,43 (N=4)	0,06 (N=4)
Seniles	2898 ± 141	3667 ± 96	4861 ± 503
	1361 ± 138	1532 ± 110	292 ± 169
	0,45 (N=4)	0,42 (N=4)	0,08 (N=4)

Tabla 3. Número de células de la microglía en DG, CA3 y PRh, mostrado como células totales (fila 1), células reactivas (fila 2) (promedio ± SEM) e índice microglía reactiva/total (fila 3) para cada grupo etario.

Correlación entre los cambios celulares y las pruebas de memoria

Se calcularon las correlaciones entre los cambios celulares y las medidas de comportamiento obtenidas dentro de cada grupo etario. Los datos correspondientes al índice de discriminación en la fase de elección del SLR se correlacionaron positivamente con el número de neuroblastos (correlación de orden de rango de Spearman: $\rho(15) = 0,629$; $p < 0,05$) y con el diámetro de los mismos (correlación de orden de rango de Spearman: $\rho(15) = 0,561$; $p < 0,05$) (**Fig. 4.11**). Además, se analizó la correlación entre la ligera reducción del área inmunorreactiva de NeuN en CA3 y el aumento del número de células de microglía reactiva en CA3 con el índice de discriminación en la fase de elección del SLR. Respecto al SOR, se realizó la correlación de la reducción del número total de células de microglía en PRh con el índice obtenido. Estos datos no mostraron relaciones significativas entre ningún par de variables.

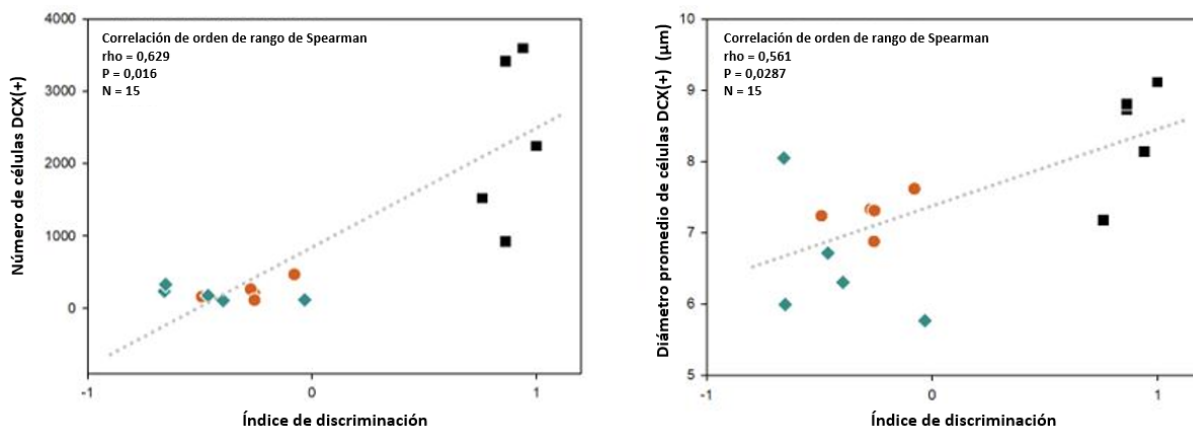


Figura 4.11. Correlación entre el desempeño en el SLR y los neuroblastos del DG. Cuadrado negro corresponde al grupo joven, círculo naranja a grupo de mediana edad y rombo verde a grupo senil.

4.4 Discusión

El trabajo presentado en este capítulo se llevó a cabo con el fin de completar la caracterización de nuestro modelo de envejecimiento y evaluar el efecto de dicho proceso sobre la memoria de reconocimiento de las ratas SD hembras. Se utilizaron estas ratas, aprovechando la experiencia de nuestro grupo – en nuestro laboratorio se ha trabajado por años con ratas SD como modelo de disfunción neuronal espontánea (a causa del envejecimiento) en el hipotálamo y la sustancia nigra (**Sanchez et al., 2003; Sanchez et al., 2008**) –, debido a que la gran mayoría de los reportes existentes hasta el momento se han hecho en machos y/o en otras cepas. Previo a este experimento, hemos trabajado con otras pruebas comportamentales, principalmente con el laberinto de Barnes, que nos ha permitido reportar la correlación entre las diferencias en la memoria espacial en ratas de 26 y 32 meses de edad y los cambios en el hipocampo (**Morel et al., 2015**), demostrando que los cambios funcionales en el cerebro se acumulan progresivamente, y llega un momento en la vida de las ratas en el cual los impedimentos mnemónicos se hacen evidentes. Teniendo entonces una caracterización previa de la memoria espacial en función de la edad, procedimos a realizar una caracterización de la memoria de reconocimiento.

En ratas, la memoria de reconocimiento se evalúa típicamente utilizando el paradigma de no coincidencia con la muestra, que hace uso de la predisposición innata de estos animales para examinar estímulos novedosos más profundamente que los conocidos. De este modo, si a la rata se le muestra un objeto (estímulo) y luego se le muestra un objeto idéntico con un señuelo novedoso, pasará más tiempo investigando el señuelo novedoso. El impacto que tiene el envejecimiento normal sobre el reconocimiento y la memoria es multifacético; uno de los tantos factores que influyen es el intervalo de tiempo entre la fase de entrenamiento y la fase de elección. Durante intervalos prolongados (24-48 h), el envejecimiento normal perjudica la memoria de reconocimiento de objetos en ratas, y se ha informado que disminuciones en la capacidad de discriminación de un objeto novedoso ocurren a intervalos más largos (**Bartolini et al., 1996; de Lima et al., 2005; Pietá Días et al., 2007; Pitsikas et al., 2005; Vannucchi et al., 1997**). Sin embargo, cuando las pruebas se realizan a intervalos cortos (minutos-horas), las ratas envejecidas se comportan como si fueran jóvenes (**Burke et al., 2010**). Otro aspecto a tener en cuenta es el protocolo de entrenamiento. Se ha encontrado que el envejecimiento perjudica tanto las tareas de reconocimiento de localización de objetos como de características de objetos cuando se utilizan sesiones de entrenamiento relativamente cortas (**Burke et al., 2010**). Sin embargo, un alto grado de refuerzo permite un mejor desempeño en la fase de elección en ratones envejecidos (**Wimmer et al., 2012**).

El agregado del grupo de 18 meses a estas pruebas cognitivas se realizó con el objeto de identificar un déficit temprano en la memoria de reconocimiento. Estas ratas estarían representando una mediana edad tardía (se consideran de mediana edad entre los 12 y 18 meses, dependiendo de la cepa y del sexo) (**Shi et al., 2004; Stouffer y Heisey, 2013**). Las alteraciones de comportamiento tempranas son indispensables para detectar los cambios que se presentan al inicio del deterioro cognitivo, y que son previos a los cambios neuropatológicos irreversibles. Las comparaciones entre los grupos de mediana edad y senil son esenciales, por tanto, para entender el proceso de envejecimiento, ya que los cambios en

el desarrollo pueden estar ocurriendo antes de que el envejecimiento de las ratas sea evidente (Coleman *et al.*, 2004).

Para evaluar el impacto del envejecimiento sobre la capacidad de discriminar recuerdos, adaptamos dos tareas de reconocimiento que son breves, sencillas y libres de estrés (Winters *et al.*, 2010) y que se basan en el paradigma de que las ratas exploran de manera espontánea la novedad. Con la base teórica de que el hipocampo es más relevante en el contexto de reconocimiento espacial de los objetos, mientras que la corteza perirrinial es más importante en el reconocimiento de las características de los mismos – su lesión afecta esta función (Abe *et al.*, 2009; Albasser *et al.*, 2009; Aggleton *et al.*, 2010) –, nos pusimos como objetivo determinar si el envejecimiento tenía un impacto diferencial en estas estructuras del lóbulo temporal en nuestras ratas. En primer lugar, implementamos una versión modificada de la tarea SLR (Bekinschtein *et al.*, 2013) para favorecer la fase de codificación/consolidación y reducir la interferencia. Nuestros resultados revelaron que las ratas pertenecientes a los grupos de mayor edad (mediana edad y senil) presentaban un déficit significativo en la retención de la memoria de reconocimiento espacial. Estos hallazgos concuerdan con un estudio de SLR en ratones envejecidos C57BL / 6 J, en el cual, con una distancia de 20 cm, los ratones más jóvenes se desempeñaron muy bien, mientras que los viejos se desempeñaron cerca del nivel del azar (Ces *et al.*, 2018). En base a esto proponemos que las ratas de mediana edad y seniles no estarían logrando consolidar la información, de modo que la misma no puede ser recuperada 24 h después de la presentación del objeto. De alguna forma, en la etapa de elección las representaciones de lugares novedosos y conocidos se estarían superponiendo en una única representación de memoria. Como se ha explicado en la sección 1.5.3 de la introducción del presente trabajo, el estado de excitabilidad de las células de un engrama es clave para la eficacia de la recuperación de un recuerdo. De este modo, una excitabilidad aumentada de las células mejoraría la precisión de la memoria a corto plazo mediante un incremento de la accesibilidad a las células del engrama y por ende la habilidad de discriminar entre contextos similares pero discernibles (mecanismo conocido como separación de patrones), manteniendo experiencias similares separadas. La separación de patrones es un mecanismo computacional que el hipocampo utiliza para desambiguar entradas de información similares (Clelland *et al.*, 2009). En las ratas envejecidas la excitabilidad neuronal se encuentra disminuida, por tanto, esta podría ser una posible explicación para la falla en la distinción de la localización novedosa.

En la tarea SOR, se requiere la distinción entre características novedosas y familiares de los objetos. Se utilizó una versión modificada de la tarea SOR – la versión similar (Miranda *et al.*, 2017) – que consiste en una fase de entrenamiento en la que las ratas se exponen a tres objetos, donde dos objetos son similares entre sí (AB y BC) y el tercero es diferente (DE). En la fase de elección, la similitud entre los objetos se manipuló variando el número de características compartidas de los objetos, resultando en un objeto novedoso (AC). Cabe mencionar que, durante la fase de entrenamiento, las ratas jóvenes y de mediana edad mostraron el mismo patrón de preferencia para los objetos AB y DE (ubicados en los extremos) y una menor preferencia por el objeto central (BC). Sin embargo, las ratas seniles desde el principio tuvieron preferencia por el objeto DE, razón por la cual exploraron menos los objetos similares (AB y BC). Este comportamiento continuó en la fase de elección, donde se observó

que las ratas seniles no mostraron interés por el objeto novedoso. De hecho, mostraron un índice de preferencia negativo, es decir, una clara preferencia por el objeto familiar frente al novedoso. Esta preferencia negativa podría deberse a una mala codificación/consolidación y a una falla consecuente en la retención a largo plazo de las entradas de información. Entonces, tal como se mencionó anteriormente para la tarea SLR, el deterioro de la memoria podría estar relacionado con un déficit en la separación de patrones. Sin embargo, para confirmar esta hipótesis, sería necesario realizar la condición diferente (de baja similitud) del SOR en ratas de mediana edad y seniles. Nuevamente, la excitabilidad impedida de las neuronas involucradas en este proceso entra en juego como un factor determinante en la falla que presentan las ratas envejecidas para discernir entre objetos similares. Pasaremos entonces a discutir más ampliamente el rol de la excitabilidad neuronal. La excitabilidad es una propiedad fisiológica intrínseca de las neuronas que establece el umbral para la generación de picos y controla la transmisión de señales (Hille, 1992). El entrenamiento comportamental induce amplios cambios en la excitabilidad neuronal tanto en invertebrados como en vertebrados (Brons y Woody, 1980; Disterhoft *et al.*, 1986; McKay *et al.*, 2009; Mozzachiodi *et al.*, 2008) y se ha propuesto que el estado de excitabilidad contribuye a la formación de la memoria (Disterhoft y Oh, 2006; Schrader *et al.*, 2002), la consolidación de la misma (Zhang and Linden, 2003) y su asignación (Cai *et al.*, 2016; Josselyn y Frankland, 2018; Lisman *et al.*, 2018; Rashid *et al.*, 2016; Yiu *et al.*, 2014). Si pensamos esto en el contexto del circuito trisináptico, cuando las células del engrama en el DG sean altamente excitables, probablemente serán más capaces de separar las señales que llegan de la corteza entorrinal a través de la vía perforante, ya que serán más sensibles que las células vecinas (no pertenecientes al engrama) a la transmisión glutamatérgica. Al mismo tiempo, las células del engrama en el DG altamente excitables promoverán la terminación mejorando la transmisión a las células del engrama en CA3 a través de la ruta de las fibras musgosas. De esta manera, los procesos de separación y terminación de patrones están habilitados por la anatomía del hipocampo y determinados por la naturaleza de la entrada perceptiva, pero ambos están influenciados significativamente en calidad y magnitud por la plasticidad de la excitabilidad celular del engrama. Dado que las ratas de edad más avanzada tienen una excitabilidad reducida de sus células, el proceso de separación y terminación de patrones se ve afectado en dichos individuos.

La PRh desempeña un importante rol en el procesamiento perceptivo. Mientras que esta estructura está involucrada en el reconocimiento de objetos al momento de representar información básica acerca de la familiaridad o novedad de un objeto, el hipocampo está involucrado en la memorización de objetos mediante la codificación de información acerca de las experiencias relacionadas con dichos objetos (Bussey *et al.*, 2002; Bartko *et al.*, 2007). El hipocampo dorsal juega un papel importante en la formación de la memoria de reconocimiento, sobre todo cuando la información espacial o contextual es un factor relevante (Goulart *et al.*, 2010). Se desconoce si las señales del entorno son capaces de provocar cambios de excitabilidad en las células del engrama y cómo estos cambios pueden influir en la recuperación de la memoria. Se ha demostrado un cambio rápido pero transitorio en el estado de excitabilidad de las células del engrama en el DG, posterior a un condicionamiento contextual de miedo y a una reactivación por señales. Este cambio aumentó la precisión y eficiencia del reconocimiento del contexto y, por lo tanto, aumentó la eficacia

de recuperación de memoria (**Pignatelli et al., 2019**). Esto nos lleva a entender el recuerdo de una memoria episódica como dos estados funcionales consecutivos de las células del engrama. En el primer estado, que corresponde al período de reposo, la excitabilidad de las células se encuentra en un nivel basal, y la exposición a estímulos condicionados activa dichas células, provocando la transmisión neuronal y una consecuente reacción conductual. La reactivación de las células del engrama desencadena un segundo estado al aumentar su excitabilidad celular. Entonces, en el primer estado celular, el nivel basal de excitabilidad no permite un reconocimiento totalmente exacto y eficiente del contexto en presencia de señales conflictivas o cuando las señales están parcialmente disponibles. Por el contrario, el segundo estado mejora la respuesta de la célula a las señales parciales, aumentando la capacidad de reconocimiento de contexto. De este modo, si la reactivación de las células involucradas en codificar el recuerdo correspondiente no es suficiente, la recuperación de la memoria no será lo suficientemente efectiva para una separación de patrones satisfactoria.

Aunque el hipocampo no puede desempeñar un papel directo en la discriminación de las diferentes características de cada objeto, es fundamental como detector de novedad por su función de comparar la información almacenada previamente con la información entrante nueva sobre ciertos aspectos de una determinada situación (**Clarke et al., 2010**). Dado que el envejecimiento provoca una marcada disminución de la función del hipocampo, es probable que esta disminución constituya un factor central en los déficits de memoria de reconocimiento observados en el presente estudio. Un creciente cuerpo de evidencia apoya la hipótesis de que las células granulares nacidas en adultos contribuyen al proceso de almacenamiento de la memoria espacial, relevante para la separación de patrones. Por ejemplo, la supresión de la neurogénesis hipocampal adulta en ratones por radiación de rayos X altera la capacidad del animal para distinguir cambios sutiles (pero no cambios bruscos) en la discriminación espacial (**Clelland et al., 2009**). Por el contrario, los niveles genéticamente aumentados de neurogénesis en adultos mejoran la discriminación espacial de dos contextos similares (**Sahay et al., 2011**). Como se mencionó anteriormente, en trabajos previos de nuestro grupo se ha informado una disminución en el número de neuronas inmaduras nacidas en adultos en el DG del hipocampo en ratas seniles (**Morel et al., 2015; Pardo et al., 2017**). El trabajo presentado en este capítulo nos permite describir por primera vez una marcada disminución en el número de neuronas inmaduras nacidas en adultos en la rata de mediana edad tardía, resultado que se condice con otros estudios (**Nacher et al., 2003; Rao et al., 2005**). El hecho de que la neurogénesis disminuya en ratas de mediana edad al mismo nivel observado en ratas seniles sugiere un agotamiento prematuro de la neurogénesis en el hipocampo. Además, una disminución en el diámetro de los neuroblastos podría ser una característica adicional del envejecimiento hipocampal. La disminución de la neurogénesis sumada al cambio morfológico y la falta de excitabilidad de las neuronas presentes en el cerebro de la rata senil son factores cruciales, desde nuestro punto de vista, para explicar el déficit cognitivo evidenciado.

La implicación de la subregión CA3 del hipocampo en el deterioro de la memoria de reconocimiento deriva de las imágenes farmacológicas, funcionales y electrofisiológicas tanto en humanos como en animales. La lesión mediante uso de ácido iboténico en la región CA3 de ratas Long Evans perjudica el reconocimiento de objetos en un estudio de terminación de

patrones (**Kesner et al., 2016**). Los estudios de resonancia magnética en humanos de edad avanzada revelan que la disminución del volumen de CA3 se correlaciona con el deterioro de la precisión del reconocimiento de objetos (**Dillon et al., 2017**). En este trabajo se examinó el área inmunorreactiva de las neuronas principales en CA3. Aunque otros investigadores no reportaron pérdida de neuronas relevantes del hipocampo en ratas de edad avanzada (**Rapp y Gallagher, 1996**), nosotros encontramos una ligera pero significativa reducción del área inmunorreactiva de NeuN en la región CA3 en ratas de mediana edad y seniles. En base a esto, nos planteamos que esta ligera disminución de las neuronas piramidales CA3 en ratas mayores podría estar afectando las entradas sinápticas de la corteza entorrinal, contribuyendo a un deterioro de la memoria de reconocimiento (**Barnes y McNaughton, 1980; Foster y McNaughton, 1991; Yassa et al., 2011**), aunque deben realizarse experimentos adicionales para confirmar esta hipótesis.

Sabemos que el reconocimiento de objetos ocurre en muchas regiones corticales, dado que la lesión o inactivación química de varias de estas regiones perjudica la memoria de reconocimiento (**Clark et al., 2000; Baker y Kim, 2002; Hammond et al., 2004; Iwamura et al., 2016; Miranda et al., 2018**). En base a esto y a lo discutido previamente en esta sección, nos enfocamos particularmente en los cambios inmunohistoquímicos que ocurren en la PRh. Utilizando el mismo método de cuantificación que el que se usó para la caracterización del hipocampo, encontramos que el área inmunorreactiva de NeuN en PRh no mostraba cambios con la edad en ratas, confirmando datos anteriores que reportaron la conservación de las neuronas corticales en dicha región (**Rapp et al., 2002**).

En cuanto a la microglía, existe un creciente cuerpo de literatura que ha revelado su papel en la homeostasis neuronal (**Ekdahl et al., 2009; Schwartz et al., 2013**). En el sistema nervioso central, la microglía constituye la línea primaria de defensa inmune. Además, desempeña funciones reguladoras y de apoyo en la función neuronal al metabolizar el glutamato, proporcionar apoyo nutricional y eliminar residuos celulares potencialmente tóxicos (**Conde y Streit, 2006; Neumann et al., 2009; Tremblay y Majewska, 2011**). En este estudio, se observó un aumento de la microglía total y de la microglía reactiva en la región hipocampal CA3 sólo en el grupo de ratas seniles. Es importante mencionar que si no hay cambios en la relación entre microglía reactiva y total, entonces este aumento de la microglía reactiva podría ser el resultado del aumento total de la microglía. En el caso del DG se observó una disminución de la microglía total sólo en las ratas seniles (la microglía reactiva permaneció inalterada). Hasta donde sabemos, el trabajo descrito en este capítulo es el primer trabajo que reporta un análisis morfométrico de microglía en la PRh de ratas envejecidas. Nuestros resultados evidenciaron una reducción del total de células microgliales en las dos cohortes de edad avanzada. Las células microgliales tienen una capacidad de autorrenovación. Sin embargo, la actividad mitótica de cada célula está limitada debido al acortamiento de los telómeros, que ocurre durante cada división celular. La evidencia creciente sugiere una senescencia replicativa microglial asociada al envejecimiento, que resulta en la degeneración y distrofia de la microglía (**Streit, 2006**). Como sugiere el trabajo de Streit, el cambio dependiente de la edad o la pérdida de funciones microgliales podría ser una posible explicación para la ocurrencia de enfermedades neurodegenerativas en individuos de edad avanzada. En un trabajo hecho en ratas macho Fisher 344 de mediana edad y seniles, se encontró un aumento del número de

microglía en el DG en ambos grupos, en contraste con una disminución de la microglía reactiva en dicha región (**McGuinness et al., 2017**). Adicionalmente, se encontró que la activación microglial se amplifica y prolonga en el hipocampo envejecido en comparación con el hipocampo adulto joven – lo cual en nuestro caso se condice sólo con los resultados en CA3, pero no con los resultados en DG. La activación microglial prolongada conduce a la liberación de citoquinas proinflamatorias que exacerban la neuroinflamación, contribuyendo a la pérdida neuronal y al deterioro de la función cognitiva (**Perry et al., 2010; Streit et al., 2004**). También se ha demostrado que la activación de la microglía podría manipular tanto el acceso a las memorias como la estructura informacional del engrama a través del refinamiento de los patrones de conectividad celular del engrama (**Hassan y Hiesinger, 2015**).

Tomando todo esto en conjunto, nuestro hallazgo principal respecto a las memorias de reconocimiento de objetos sugiere que el envejecimiento afecta tanto a ratas de mediana edad como seniles. El hecho de que las ratas de mediana edad se vean menos afectadas en la tarea SOR que en la tarea SLR podría explicarse asumiendo que la PRh, requerida para el nodo discriminador de las características del objeto, está menos afectada por el envejecimiento que el hipocampo (en el caso de esta estructura, no sólo hay una excitabilidad impedida de las células involucradas, sino también una importante reducción en el número de las neuronas inmaduras).

Estos resultados son de gran importancia dado que son, a nuestro entender, la primera evidencia presentada sobre el efecto del envejecimiento en la memoria de reconocimiento de objetos considerando la ubicación y características de los mismos en ratas SD hembras. A su vez dichos resultados proporcionan información importante sobre los déficits de memoria de reconocimiento de objetos relacionados con la edad en estas ratas y ofrecen medios adicionales para evaluar el impacto del envejecimiento en regiones separadas como el circuito del hipocampo DG-CA3 y la PRh.

4.5 Conclusiones

- La memoria de reconocimiento de objetos de las ratas hembra SD se ve afectada por el proceso de envejecimiento en ambos paradigmas evaluados (de localización y características).
- El desempeño cognitivo de las ratas de mediana edad muestra un declive en cuanto a localización del objeto, pero el reconocimiento de características del mismo se mantiene intacto en esta cohorte.
- Teniendo en cuenta recientes estudios que soportan la evidencia de que el reconocimiento de localizaciones y de características de objetos ocurren por separado, en el hipocampo y en la corteza perirrinal respectivamente, nuestros resultados sugieren que el hipocampo es más vulnerable a los efectos del envejecimiento que la corteza perirrinal.
- Entendiendo que el hipocampo es una región que presenta disfunción temprana en cuanto a la memoria espacial y la memoria de reconocimiento, dicha región resulta un excelente modelo para implementar terapia génica regenerativa con el fin de revertir los cambios genéticos, bioquímicos y celulares presentes en la vejez.

Capítulo V: Puesta a punto del reloj epigenético en rata

5.1 Objetivo específico

Poner a punto un reloj epigenético en diferentes tejidos y en el cerebro para el modelo biológico utilizado en nuestro laboratorio, la rata hembra SD, con el fin de sumar este biomarcador al conjunto de herramientas que nos permitirán evaluar los efectos de la reprogramación celular en el cerebro de la rata senil.

5.2 Materiales y métodos

5.2.1 Animales

Para la puesta a punto del reloj epigenético en la rata, se utilizaron 4 grupos etarios de ratas hembra SD: jóvenes (3,7 meses; n=11), adultas (8 meses; n=9), de mediana edad (15,7 meses; n=6) y seniles (25,5 meses; n=14).

Los animales fueron mantenidos en una habitación con temperatura controlada (22 ± 3 °C), con ciclos de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad (luces de 7 am a 7 pm), llevándose a cabo las pruebas siempre durante la fase de luz, con agua y alimento disponibles *ad libitum*. Los protocolos animales fueron éticamente evaluados y aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la FCM, UNLP (P05-02-2017).

5.2.2 Eutanasia y recolección de muestras

Recolección de sangre

Se pesaron las ratas y se anestesiaron con isofluorano para extraer sangre de las venas de la cola, colectando la misma en tubos Eppendorf con 10 µl de EDTA 0,342 mol/l para 500 µl de sangre. Acto seguido se sacrificaron los animales por decapitación.

Disección del cerebro

Se removió el cerebro cortando cuidadosamente los nervios óptico y trigémino y el tallo pituitario. Se pesó y se colocó en una placa fría para proseguir con la disección del mismo evitando la degradación tisular. Luego de extraer y pesar la adenohipófisis, ubicada en la base del cerebro, se procedió a la disección del mismo. Se diseccionaron la corteza prefrontal, el hipocampo, el hipotálamo, la *substancia nigra* y el cerebelo mediante el uso de fórceps. Para ello, primero se colocaron los cerebros con su lado ventral hacia arriba y se realizó una segunda incisión coronal en el centro de la eminencia media (-3,6 mm desde el bregma) (**Fig. 5.1**). Luego, se separó el cerebelo del cerebro y la médula oblonga (**Fig. 5.2**). Para aislar el hipotálamo medio basal (MBH, del inglés *mediobasal hypothalamus*), se tomó parte del bloque anterior y otra parte del bloque posterior (**Fig. 5.3**). El hipocampo fue diseccionado de la corteza en ambos hemisferios (**Fig. 5.4**), también en el bloque anterior y posterior del cerebro, colocando alternativamente el lado caudal cerebral y el lado rostral hacia arriba. Para diseccionar la *substancia nigra*, en cada hemisferio se extrajo una sección de tejido de 1 mm de espesor de la parte posterior del cerebro (-4,6 mm desde el bregma) (**Fig. 5.5**). Finalmente, se colocó el bloque anterior con su lado dorsal hacia arriba para separar la corteza prefrontal. Con un bisturí afilado, se hizo un corte a 2 mm de la fisura longitudinal y otro corte a 5 mm de la misma. Adicionalmente se realizaron dos cortes perpendiculares, a 3 mm y 6 mm del punto más rostral, obteniendo un bloque de corteza prefrontal de aproximadamente 9 mm² (**Fig.**

5.6). Luego de la disección, cada muestra se colocó inmediatamente en un tubo Eppendorf y se sumergió en nitrógeno líquido. Al finalizar el procedimiento entero, se llevaron las muestras a - 80 °C, donde se mantuvieron hasta el momento de enviarlas a la Universidad de California.

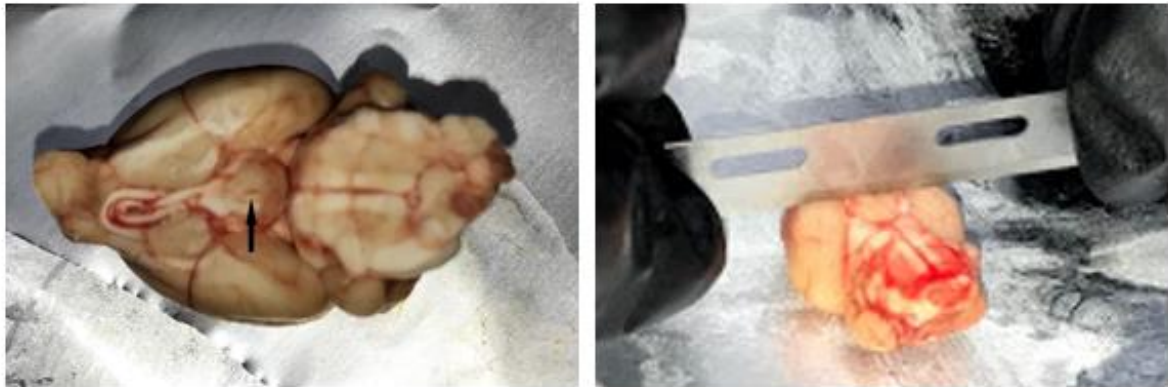


Figura 5.1. Incisión en la eminencia media (indicada con flecha en la imagen de la izquierda).



Figura 5.2. Disección del cerebelo (indicado con círculo).



Figura 5.3. Bloques anterior y posterior resultantes del corte coronal en la eminencia media (izquierda). Disección del hipotálamo (derecha) llevada a cabo en ambos bloques.



Figura 5.4. Diseción del hipocampo. En este caso se muestra un hemisferio ya removido y el otro presente, en el bloque anterior del cerebro, resultante del corte coronal en la eminencia media.



Figura 5.5. Diseción de *substancia nigra*. En este caso se muestra un hemisferio ya removido y el otro presente, en el bloque posterior del cerebro, resultante del corte coronal en la eminencia media.

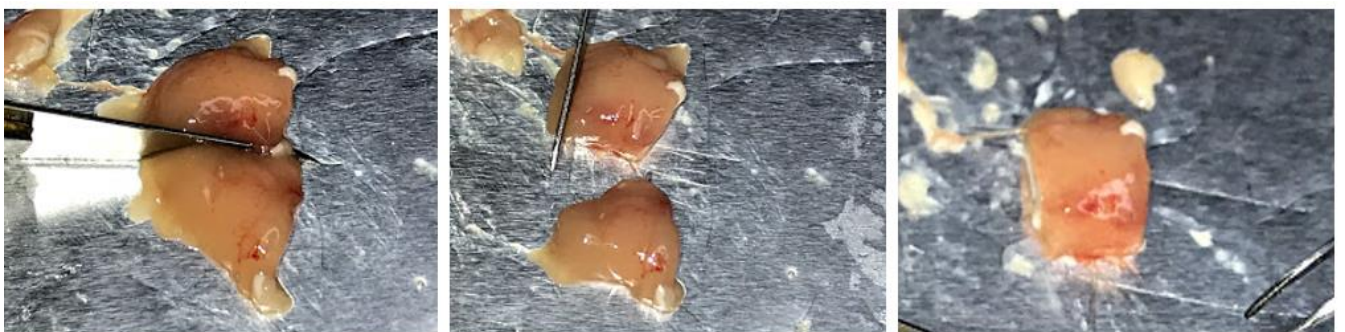


Figura 5.6. Diseción de la corteza prefrontal. Se muestran los cortes consecutivos realizados para obtener el bloque observado en la última imagen.

Diseción de tejidos

Se procedió a extraer los ovarios (enteros), una muestra de tejido hepático, tejido adiposo y tejido cutáneo perteneciente a la parte distal de la cola. Todas las muestras se colocaron en tubos Eppendorf y se colocaron en nitrógeno líquido hasta el final del procedimiento. Luego

se llevaron a - 80 °C, donde se mantuvieron hasta el momento de enviarlas a la Universidad de California.

- Pituitaria anterior: utilizando fórceps se extirpó la duramadre que cubre la glándula dejando el órgano libre, en la silla turca. El lóbulo neural se separó cuidadosamente de la hipófisis anterior que luego se levantó cuidadosamente con fórceps de punta curvada apuntando hacia arriba.
- Ovarios: se diseccionó el aparato genital cortando el mesenterio para aislar los cuernos uterinos, el oviducto tubular, los ovarios y la unión entre el ano/recto y la vulva/vagina, dejando aislada la unidad de los órganos sexuales y la vejiga urinaria. Los ovarios se separaron cuidadosamente de los oviductos.
- Hígado: la extracción de tejido hepático se realizó cortando un trozo del lóbulo mediano (0,5 cm x 0,5 cm).
- Tejido adiposo: se obtuvieron muestras de tejido adiposo del intestino delgado.
- Piel de la cola: para el tejido de la piel, se cortaron 5 cm de una parte distal de la cola con tijeras. Se separó la piel y se eliminó el vello con bisturí.

5.2.3 Puesta a punto del reloj epigenético

Lo explicado a partir de este punto es trabajo realizado por el Dr. Stephen Horvath y su grupo, en la Universidad de California, Estados Unidos.

Muestras

Se analizaron en total n=593 muestras de tejido de rata de 13 fuentes diferentes de ADN (provenientes de nuestro laboratorio en Argentina, de dos laboratorios de Estados Unidos, y de un laboratorio de India). Las edades oscilaron entre 0,5 y 30 meses. Los datos en ratas se componían de un conjunto de entrenamiento (n=517) y un conjunto de pruebas (n=76). Para construir relojes que puedan aplicarse tanto a humanos como a ratas, se añadieron n=850 muestras de tejido humano a los datos de entrenamiento. Se entrenaron/desarrollaron dos relojes epigenéticos para humano-rata y cuatro relojes para rata: un reloj multi-tejido basado en todos los tejidos disponibles, un reloj cerebral basado en regiones de todo el cerebro – hipocampo, hipotálamo, neocórtex, *substancia nigra*, cerebelo y glándula pituitaria –, un reloj hepático basado en todas las muestras hepáticas y un reloj sanguíneo.

Extracción de ADN de las muestras

Se extrajo el ADN de la sangre en una plataforma automatizada de extracción de ácido nucleico llamada QiaSymphony (Qiagen) con un kit de extracción basado en perlas magnéticas, QIASymphony DNA Midi Kit (Qiagen).

Se extrajo el ADN de las regiones cerebrales utilizando una plataforma automatizada de extracción de ácido nucleico llamada QIAcube HT (Qiagen) con un kit de extracción basado en columnas, QIAamp 96 DNA QIAcube HT Kit (Qiagen).

Se extrajo el ADN del tejido en una plataforma automatizada de extracción de ácido nucleico llamada Anaprep (Biochain) con un kit de extracción basado en perlas magnéticas, Tissue DNA Extraction Kit (Biochain).

Perfil de metilación del ADN

Los datos de metilación se generaron utilizando el chip Illumina personalizado "HorvathMammalMethylChip40" (Arneson *et al.*, 2022). Por diseño, este arreglo de metilación facilita los estudios epigenéticos en distintas especies de mamíferos (incluyendo ratas y humanos) debido a su muy alta cobertura de CpGs altamente conservadas en este grupo. Se empleó el análisis de secuencias bioinformáticas para identificar 36 mil CpGs altamente conservadas en 50 especies de mamíferos. No todas las sondas de las 36 mil funcionan para todas las especies, sino que cada sonda está diseñada para cubrir un determinado subconjunto de especies, de manera que en general todas las especies tienen un gran número de sondas. Para medir los niveles de metilación de una muestra es necesario extraer el ADN y realizar un tratamiento del mismo con bisulfito. Este tratamiento convierte los residuos de citosina a uracilo, dejando a los residuos de 5-metilcitosina inalterados, de modo que sólo se mantienen las citosinas metiladas (Fig. 5.7).

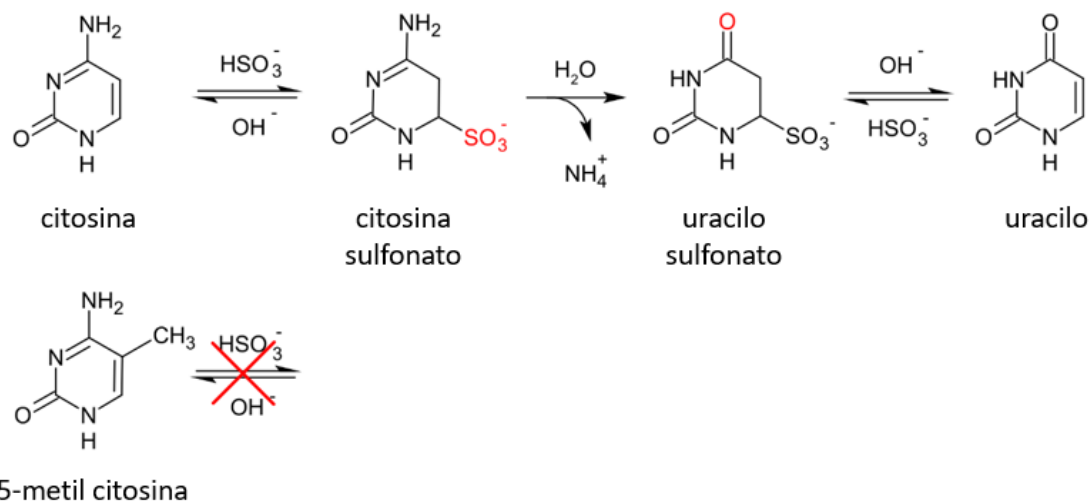


Figura 5.7. Esquema de la reacción química por la que el bisulfito cataliza la conversión de citosina a uracilo.

Luego del tratamiento con bisulfito, se realiza una amplificación por PCR para preparar la biblioteca. Durante los varios ciclos de PCR, las citosinas que se convirtieron en uracilos se terminan convirtiendo en timinas.

El ensayo de metilación Infinium utiliza dos sondas específicas del sitio, una diseñada para el locus metilado (M), y otra para el locus no metilado (U). La extensión de dichas sondas incorpora un ddNTP marcado con un reactivo fluorescente. El nivel de metilación para el locus estudiado se determina calculando la relación de las señales fluorescentes de los sitios metilados frente a los no metilados (Fig. 5.8).

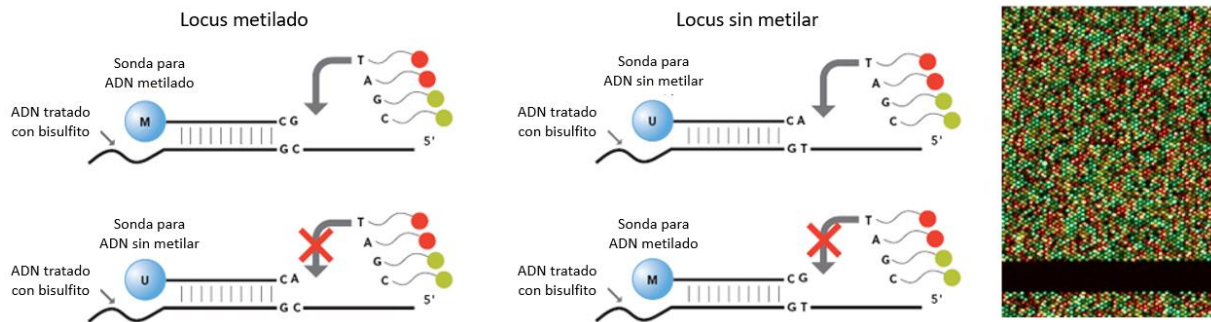


Figura 5.8. Ensayo de metilación Infinium. La sonda U coincide con el sitio CpG no metilado y la sonda M coincide con el sitio metilado. En el locus metilado, la unión con la sonda M permite la extensión de la misma por incorporación de una sola base, mientras que inhibe la extensión de la sonda U. En el caso del locus no metilado, ocurre lo contrario, es decir se da la extensión de la sonda U pero se inhibe la extensión de la sonda M. El fluoróforo de la base que se una para extender la sonda determinará lo que se vea en los resultados, en el iScan array (derecha).

Modelos de regresión utilizados

Los relojes se desarrollaron realizando la regresión entre la edad cronológica de todas las CpGs pertenecientes al genoma de *Rattus norvegicus*. La edad no se transformó. Se usaron todos los tejidos para el reloj multi-tejido y se restringió el análisis a sangre, hígado y tejido cerebral para los relojes de sangre, hígado y tejido cerebral, respectivamente. Se crearon modelos de regresión penalizados mediante un algoritmo que se ajusta a modelos de regresión lineal, logística y multinomial, entre otros, e incluye métodos para la predicción y funciones para la validación cruzada. Los métodos de validación son estrategias que permiten estimar la capacidad predictiva de los modelos que se aplican a nuevas observaciones, haciendo uso únicamente de los datos de entrenamiento. Se basan en ajustar el modelo empleando un subconjunto de entrenamiento para evaluar con las observaciones restantes. Este proceso se repite varias veces y los resultados se promedian, compensando mediante dichas repeticiones las posibles desviaciones que puedan surgir por el reparto aleatorio de las observaciones. El esquema de validación cruzada elegido consiste en dejar afuera de la regresión una sola muestra (LOOCV, del inglés *leave one out cross validation*), que se excluye para emplearla como validación. Si se emplease una única observación para calcular el error, variaría mucho dependiendo de la observación seleccionada. Así, se repite el proceso tantas veces como observaciones haya disponibles, excluyendo en cada iteración una observación distinta. Finalmente, el error estimado es el promedio de todos los errores calculados.

Estimación de la edad relativa

Para introducir un significado biológico a las estimaciones de edad de ratas y seres humanos y superar el inevitable sesgo debido a la distribución desigual de los puntos de datos de ratas y seres humanos en el rango de edad, se realizó la estimación de la edad relativa utilizando la fórmula: $Edad\ relativa = Edad / Vida\ máxima$, donde la vida máxima para ratas y seres humanos se fijó en 3,8 años y 122,5 años, respectivamente.

5.3 Resultados

5.3.1 Relojes desarrollados

Se desarrollaron seis relojes diferentes para ratas que se distinguen en varias dimensiones (tipo de tejido, especie y medida de edad). Algunos relojes se aplican a todos los tejidos (relojes multi-tejidos), mientras que otros están hechos para tejidos u órganos específicos (cerebro, sangre, hígado). Se entrenaron cuatro relojes específicos de rata (multi-tejido, cerebro, sangre y hígado) y dos relojes de rata-humano, que se aplican a ambas especies (**Fig. 5.9**). Los dos relojes multi-tejido humano-rata son distintos, dado que uno estima la edad absoluta (en unidades de años) y el otro estima la edad relativa, que es la relación entre la edad y la esperanza de vida máxima, con valores entre 0 y 1. Esta relación permite una alineación y una comparación biológicamente significativa entre especies con una esperanza de vida muy diferente (rata y humano), lo que no se logra con la mera medición de la edad absoluta. Para llegar a estimaciones imparciales de los seis relojes epigenéticos, se utilizó la validación cruzada de los datos de entrenamiento y la evaluación de los mismos con un conjunto de datos de prueba independiente. El estudio de validación cruzada reporta estimaciones imparciales de la correlación de edad R (definida como correlación Pearson entre la estimación de edad (edad ADN_m) y la edad cronológica), así como la mediana del error absoluto. Las estimaciones de validación cruzada de las correlaciones de edad para los seis relojes son superiores a 0,9. Los cuatro relojes de rata presentan errores absolutos medios que oscilan entre 1,4 meses para el reloj de sangre y 2,3 meses para el reloj multi-tejido (**Fig. 5.9 A-D**). El reloj para humano y rata para edad absoluta genera una correlación de edad de $R=0,99$ cuando ambas especies se analizan juntas (**Fig. 5.9 E**), pero menor cuando el análisis se limita a tejidos de rata solos ($R=0,83$, **Fig. 5.9 F**). Por el contrario, el reloj para humano y rata para la edad relativa muestra una alta correlación independientemente de si el análisis se realiza con muestras de ambas especies ($R=0,96$, **Fig. 5.9 G**) o solo con muestras de rata ($R=0,92$, **Fig. 5.9 H**). Esto demuestra que la edad relativa elude el sesgo inherente cuando se mide la edad absoluta de especies con esperanzas de vidas muy diferentes utilizando una única fórmula.

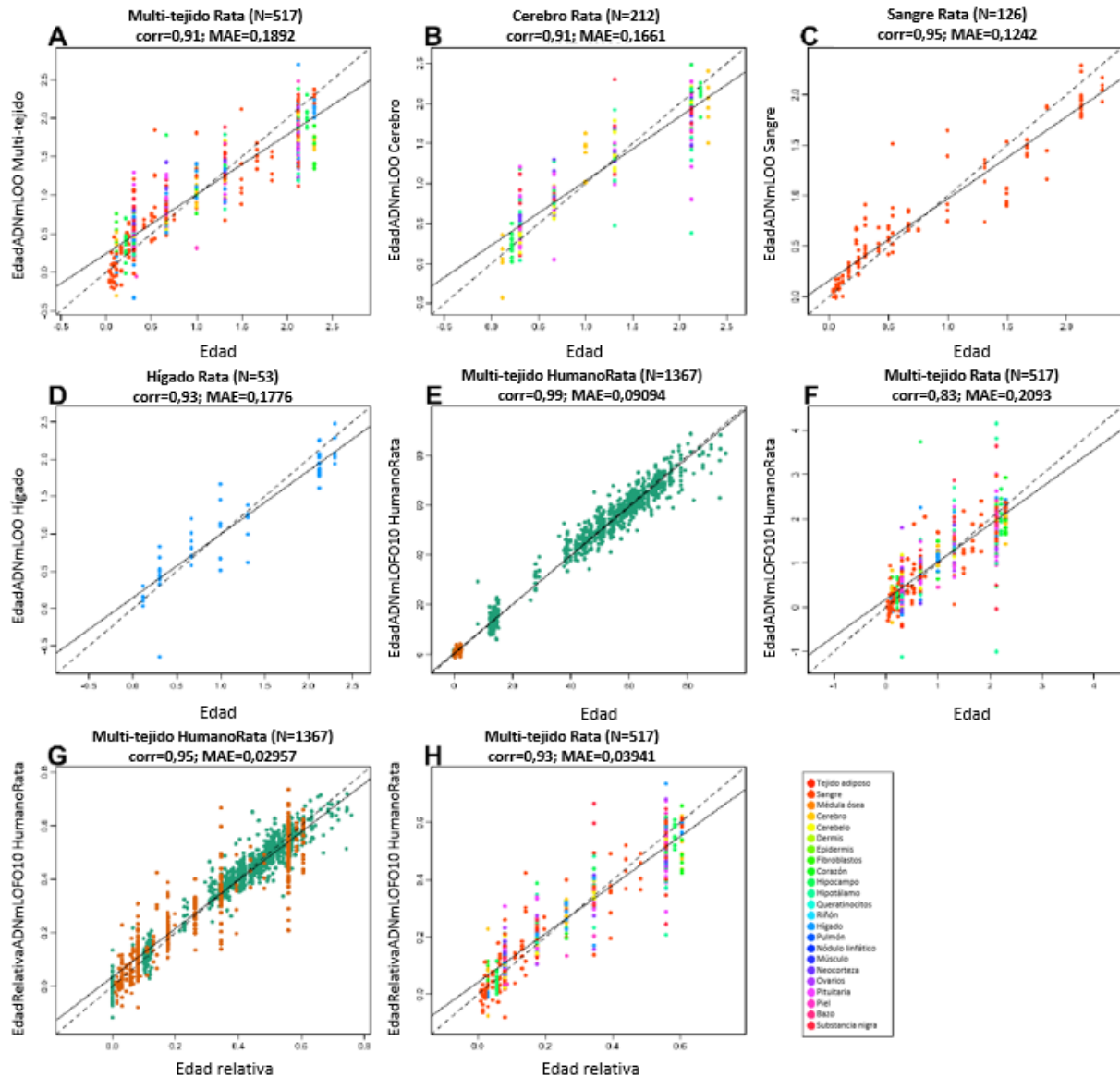


Figura 5.9. Estudio de validación cruzada de seis relojes epigenéticos para rata. **A-D)** Cuatro relojes epigenéticos entrenados sólo en tejidos de rata. **E-H)** Dos relojes epigenéticos multitejido para edad absoluta o edad relativa entrenados en rata o en rata y humano. Estimación de la edad de metilación del ADN mediante el método LOO (eje y, en años) versus la edad cronológica (eje x, en años) para **A)** reloj multi-tejido de rata, **B)** reloj de cerebro de rata, **C)** reloj de sangre de rata, y **D)** reloj hepático de rata. Los puntos están coloreados por **A)** tipo de tejido o **B)** región cerebral. **E-F)** Estimación del reloj para humano y rata de la edad absoluta. **G-H)** Estimación del reloj para humano y rata de la edad relativa. Estimaciones cruzadas de diez veces la edad (eje y, en años) en **E, G)** muestras humanas (verde) y muestras de rata (naranja) y **F, H)** muestras de rata únicamente (coloradas por tipo de tejido). Cada panel informa del tamaño de la muestra, coeficiente de correlación, error absoluto medio (MAE).

5.3.2 Reloj multi-tejido de rata

El reloj multi-tejido de rata (**Fig. 5.9 A; Fig.5.10**) es muy preciso en la estimación de la edad de todas las muestras de tejido analizadas, por ende es el reloj elegido por nuestro grupo para evaluar los resultados de los experimentos siguientes a esta puesta a punto.

Multi-tejido Rata (N=517)
corr=0,91; MAE=0,1892

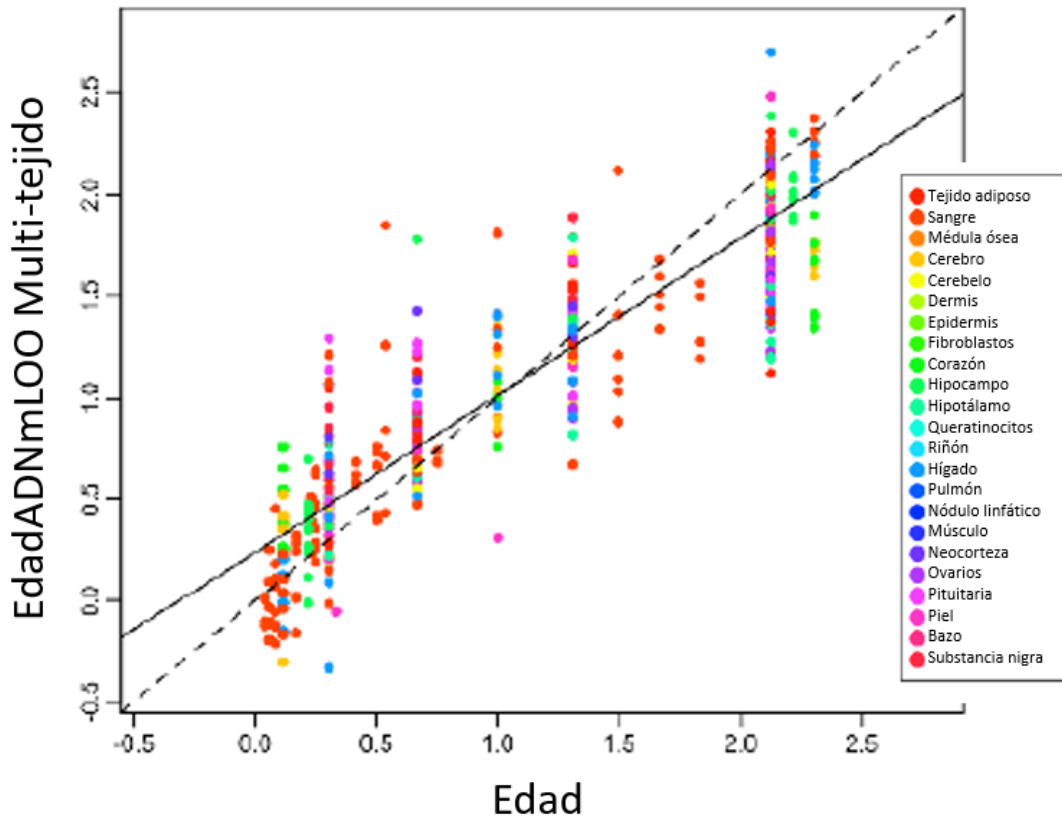


Figura 5.10. Reloj multi-tejido de rata. En el eje y tenemos la estimación de la edad de metilación del ADN (en años) y en el eje x la edad cronológica (en años). Esta estimación se hizo a partir de 517 muestras, y el coeficiente de correlación obtenido entre la edad de metilación y la edad cronológica fue de 0,91, con un error absoluto medio de 0,1892.

5.4 Discusión

Los relojes epigenéticos para humanos han encontrado muchas aplicaciones biomédicas incluyendo la medición de la edad en ensayos clínicos humanos (**Horvath y Raj, 2018; Fahy et al., 2019**). Estos relojes proporcionan una medida estándar del estado de metilación del ADN en función de la edad cronológica. Teniendo en cuenta la gran precisión de estos biomarcadores, la divergencia con respecto a la edad cronológica encontrada fue particularmente importante, ya que reveló la asociación entre una edad epigenética acelerada y un aumento del riesgo asociado a una serie de afecciones y patologías. Así, la edad arrojada por el reloj epigenético se conoce como edad biológica. El reloj epigenético como biomarcador nos permite conocer la edad biológica real de un individuo, lo cual se traduce en conocer su aptitud en relación con su propia especie. Esto es de suma importancia a nivel clínico, dado que en un futuro podrían identificarse patologías que no son evidentes, y tratarlas antes de que fuese demasiado tarde.

El desarrollo del reloj epigenético en humanos impulsó el deseo de desarrollar relojes similares para animales, particularmente para ratones, que son un modelo de estudio bien

establecido. El desarrollo de dichos relojes permitió modelar la edad epigenética de dicho animal y al mismo tiempo cuestionar los modelos existentes de envejecimiento de ratón con respecto al envejecimiento epigenético. De hecho, numerosos relojes epigenéticos de ratón se han desarrollado y validado con éxito contra factores como la rapamicina, la restricción calórica y la ablación del factor de crecimiento, factores bien caracterizados por sus efectos sobre el envejecimiento (**Petkovich *et al.*, 2017; Cole *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017; Thompson *et al.*, 2018; Meer *et al.*, 2018**). Si bien los ratones como modelo biológico presentan varias ventajas, también suponen varios desafíos. Por ejemplo, su tamaño, considerado una gran ventaja en cuanto a la mantención y manipulación, presenta una limitación en estudios que requieren analizar, por ejemplo, moderadas o grandes cantidades de sangre tomadas con cierta frecuencia. Entonces surgió la necesidad de desarrollar un reloj epigenético que pudiera aplicarse a ratas, como una necesidad de la comunidad científica en general, y particularmente de nuestro interés en el laboratorio, dado que es el modelo biológico que utilizamos y que uno de los objetivos de nuestra investigación es implementar en dicho modelo una terapia regenerativa esperando observar efectos rejuvenecedores en los animales. Por estas razones, un biomarcador de semejante precisión es considerado una herramienta invaluable para nuestros experimentos. Esto fue lo que nos llevó, en el año 2019, a establecer una colaboración con el Dr. Horvath con la intención de establecer un reloj epigenético que pudiera aplicarse a nuestro modelo de estudio.

El desarrollo de los seis relojes epigenéticos de rata descrito en este capítulo se basó en los datos de metilación del ADN obtenidos de trece tipos de tejido de rata, demostrando la factibilidad de construir relojes epigenéticos para dos especies basados en una única fórmula matemática. Más allá de su utilidad, estos relojes revelan varias características respecto a la biología del envejecimiento. En primer lugar, el reloj multi-tejido de rata reafirma la implicancia del reloj multi-tejido de humano, que es que el envejecimiento podría ser un proceso biológico coordinado que está armonizado en todo el cuerpo. Dado que el sistema circulatorio irriga y conecta todos los órganos, es más probable que la regulación y armonización de la edad estén mediadas sistémicamente. En segundo lugar, la capacidad de combinar estos dos relojes multi-tejido en un único reloj multi-tejido apto tanto para humano como para rata da nota de la alta conservación del proceso de envejecimiento en dos especies evolutivamente distantes. Entonces se hace evidente que el mecanismo que sustenta el envejecimiento es un proceso biológico muy primitivo que aseguró su conservación en el reino mamífero a través del tiempo. Esto implica, aunque no garantiza, que los tratamientos que alteren la edad epigenética de las ratas, medida con el reloj para humano y rata, pueden ejercer efectos similares en los seres humanos. Si esto se validase, supondría un cambio radical en la investigación sobre el envejecimiento.

Como se mencionó en la sección de resultados, el reloj multi-tejido de rata es sumamente preciso para muestras provenientes de varios tejidos, incluyendo tejidos cerebrales, de especial importancia en nuestra investigación. Por tal motivo, este reloj es el que seleccionamos como el más adecuado para utilizar en experimentos siguientes a esta puesta a punto. Hasta el momento hemos utilizado esta herramienta en dos experimentos: el primero con el objetivo de correlacionar la edad de metilación en el hipocampo de nuestras ratas con su desempeño cognitivo – que se discutirá brevemente aquí pero no se presentará como parte

de la presente tesis por ser parte de la tesis de la Dra. Priscila Chiavellini – y el segundo, con el fin de evaluar si la edad epigenética de las ratas se ve alterada por el tratamiento con el vector portador de los genes de Yamanaka. Este último experimento se describirá en el siguiente capítulo.

En el primer experimento mencionado, se utilizaron dos grupos de ratas hembra SD (un grupo joven, de 2,6 meses, y un grupo senil, de 26,6 meses). Los animales se sometieron al test de Barnes – que será explicado en detalle en la sección 6.2.3 de esta tesis (siguiente capítulo) – para evaluar su memoria espacial. Tal como se esperaba, y en línea con los resultados obtenidos en memoria de reconocimiento, se encontró que el desempeño cognitivo de los animales declina al aumentar su edad. Al finalizar la prueba, se procedió a sacrificar los animales y extraer sus cerebros para realizar la disección de los mismos. En este caso se diseccionó únicamente el hipocampo, que es la región del cerebro relacionada a la memoria espacial. Se enviaron las muestras de hipocampo junto con muestras de sangre a la Universidad de California para la extracción de su ADN y la obtención del metiloma de las mismas. La correlación entre la edad de metilación del hipocampo y la edad cronológica de las ratas fue muy alta ($R=0,99$), confirmando la precisión del reloj elegido. Los mismos datos confirmaron, además, que el tiempo epigenético se mueve más rápido que el tiempo físico en las ratas jóvenes (edad epigenética mayor que la edad cronológica), y esta velocidad disminuye a edades avanzadas (edad epigenética menor que la edad cronológica en el caso del grupo de ratas seniles) (**Fig. 5.11**). Se encontró una correlación estadísticamente significativa entre la edad de metilación del hipocampo y la edad de metilación de la sangre de las ratas, así como entre los parámetros cognitivos evaluados y la edad epigenética del hipocampo. Por otro lado, se encontró una correlación negativa entre los parámetros cognitivos y 14 CpGs relacionadas a factores de transcripción implicados en el desarrollo del sistema nervioso. Estos resultados sugieren que el aumento de la metilación en las CpGs de estos genes en el hipocampo de ratas viejas puede tener un impacto negativo en el desempeño cognitivo de los animales (**Chiavellini *et al.*, 2022**).

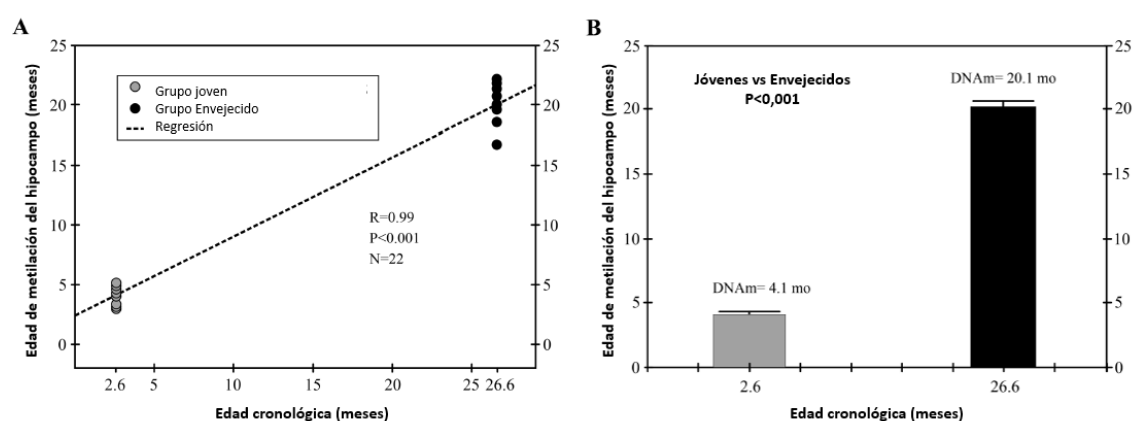


Figura 5.11. Correlación de la edad de metilación del hipocampo con la edad cronológica de las ratas. **A)** Regresión de la edad de metilación del hipocampo (eje y, en meses) versus la edad cronológica (eje x, en meses). Si bien se observa una alta correlación entre ambas edades, la pendiente no es 1, mostrando que existe una diferencia entre las mismas. **B)** Se presenta la misma información como gráfico de barras. Se visualiza más fácilmente la diferencia entre el tiempo biológico y el cronológico: para las ratas de 2,6 meses, la edad biológica

obtenida es de 4,1 meses, mientras que para las ratas de 26,6 meses se obtuvo una edad biológica de 20,1 meses (la tasa de cambios es mayor en los animales jóvenes y disminuye en los animales envejecidos).

Como se ha explicado en la sección 1.2.1 de la introducción, el ADN metilado se asocia con la inducción de un estado cerrado de la cromatina mediante el reclutamiento de complejos de proteínas que llevan a la represión de la misma. En el cerebro, la metilación regula las actividades neuronales y la formación de memoria mediante el control de la expresión génica en las neuronas (**Liu *et al.*, 2009**). Al parecer, la codificación de la memoria modifica la estructura de la cromatina para facilitar el acceso a la misma por parte de enhancers que son los que interactúan con promotores al momento de recuperar un recuerdo (**Marco *et al.*, 2020**). Así, las células pertenecientes a un engrama se convierten en células epigenéticamente cebadas luego de la etapa de codificación. Durante la recuperación de la memoria, cuando se reactiva el engrama, esas células sufren cambios transcripcionales. Estas modificaciones epigenéticas que ocurren en el engrama durante el aprendizaje son estables y persisten (**Fernandez-Albert *et al.*, 2019**). En cuanto al almacenamiento, se ha hipotetizado que luego del aprendizaje, las neuronas cambian de un estado epigenético permisivo a mantener un transcriptoma que facilita el almacenamiento a largo plazo (**Kyrke-Smith y Williams, 2018**).

Se ha demostrado que hay una pérdida global de ADN metilado en el cerebro de la rata envejecida (**Bird, 2002**). En línea con estos hallazgos, los resultados del trabajo de nuestro grupo mencionado anteriormente en esta sección revelan que el envejecimiento del hipocampo se asocia a una desmetilación predominante del ADN (73 % de hipometilación contra 15 % de hipermetilación) (**Chiavellini *et al.*, 2022**). Los resultados obtenidos del análisis del perfil metilómico en el cerebro de ratas concuerdan con la observación más general de que, casi invariablemente, el envejecimiento de los mamíferos está asociado con la hipometilación de las CpGs, particularmente en secuencias repetitivas de ADN (**Bjornsson *et al.*, 2008; Bollati *et al.*, 2009; Bormann *et al.*, 2016; Christensen *et al.*, 2009**). Es probable que esto sea al menos parcialmente responsable de la pérdida de heterocromatina durante el envejecimiento. En el hipocampo, el envejecimiento no parece tener un impacto significativo en los niveles de metilación de las islas CpG, ya que sólo el 12 % de las CpGs metiladas diferencialmente se localizaron en dichas regiones de ADN.

El hallazgo de que, en ratas viejas de la misma edad cronológica (26,6 meses), existe un conjunto de 14 CpG hipermetiladas (cerca o en factores de transcripción específicos) cuyos niveles de metilación están asociados significativamente e inversamente a la función de memoria espacial sugiere, aunque no demuestra, que los niveles de metilación de esas CpGs están implicados causalmente en el deterioro observado de la función de la memoria espacial relacionado con la edad. La hipótesis se ve reforzada por el hecho de que algunas de las 14 CpGs son proximales a genes de las familias *Zic* y *Gli*. Debido a que los genes *Zic* y *Gli* están involucrados en el desarrollo del sistema nervioso, es concebible que, durante toda la vida de las ratas, los niveles de metilación de esas CpGs aumenten continuamente, disminuyendo la expresión de genes hipocampales importantes para el desempeño de la memoria espacial.

Si bien se espera que los cambios relacionados con la edad de metilación del ADN ocurran en las neuronas del hipocampo, es importante señalar que los patrones de expresión génica glial-

específicos se ven alterados en mayor medida que los patrones de expresión génica neuronal-específicos con la edad (**Soreq et al., 2017**), sugiriendo que el envejecimiento podría tener un profundo efecto en la función glial. Respecto a las neuronas hipocampales, se ha reportado que las neuronas del DG y CA1 muestran perfiles de expresión diferentes luego de la activación por aprendizaje (**Jaeger et al., 2018**). Durante la consolidación de la memoria a largo plazo, las células del engrama también sufren cambios en su perfil transcriptómico. Hay cambios ocurriendo semanas después de la codificación. Durante la recuperación de la memoria, las células parecen tener un programa transcripcional distintivo asociado con la codificación. Este programa está acompañado de reorganización de la cromatina indicando la implicación de las modulaciones epigenéticas (**Ortega-de San Luis y Ryan, 2022**). En conjunto, estos factores podrían ayudar a explicar el declive en el desempeño cognitivo observado en las ratas de edad avanzada, y también podrían extrapolarse a estudios previos (por ejemplo, la caracterización del modelo de envejecimiento en cuanto a memoria de reconocimiento, abarcado en el capítulo anterior) para complementar las hipótesis que han ido surgiendo durante la discusión de los mismos.

5.5 Conclusiones

Se logró establecer un reloj epigenético multi-tejido de rata que mostró diferencias entre las edades de metilación de los tejidos estudiados, entre ellos – de particular interés para nuestra investigación – hipocampos de las ratas jóvenes y seniles. Esta herramienta será ampliamente utilizada para caracterizar los efectos de la terapia génica con los OSKM *in vivo* en las ratas seniles, así como en futuras terapias implementadas en el laboratorio.

Capítulo VI: Terapia génica regenerativa con OSKM en el hipocampo de la rata senil

6.1 Objetivo específico

Implementar terapia génica regenerativa con los genes OSKM en el hipocampo de las ratas seniles para restaurar la función neuronal y mejorar el déficit cognitivo. Este objetivo se basa en la hipótesis de que la terapia con los genes OSKM en el cerebro de la rata SD hembra senil es capaz de revertir el declive cognitivo observado mediante reprogramación celular.

6.2 Materiales y métodos

6.2.1 Animales

Se utilizaron ratas hembra SD jóvenes (2 meses; n=2) para chequear la expresión de los vectores en el hipocampo, y ratas jóvenes (3,8 meses; n=12) y seniles (26,8 meses; n=22) para el experimento. Las ratas jóvenes no recibieron tratamiento, mientras que las seniles se dividieron en dos grupos, uno experimental que recibió el vector HD-OSKM conteniendo los genes de Yamanaka y el gen de la *gfp* (n=10) y uno control que recibió el vector RAd-GFP, que sólo contiene el gen de la *gfp* (n=12).

Los animales fueron mantenidos en una habitación con temperatura controlada (22 ± 3 °C), con ciclos de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad (luces de 7 am a 7 pm), llevándose a cabo las pruebas siempre durante la fase de luz, con agua y alimento disponibles ad libitum. Los protocolos animales fueron éticamente evaluados y aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la FCM, UNLP (Protocolo #06-08-2018).

6.2.2 Cirugía estereotáxica

Se puso a punto la inyección en la zona subgranular del DG del hipocampo definiendo las siguientes coordenadas: 3,5 mm anteroposterior, ± 2 mm mediolateral y - 4 mm dorsoventral (trayectoria de la aguja), relativas al bregma (**Paxinos y Watson, 2007**) (**Fig. 6.1 A**). Se utilizaron jeringas Hamilton de 10 μ l.

Sólo las ratas seniles fueron sometidas a cirugía estereotáxica. Los animales se anestesiaron con 0,3 ml de ketamina intraperitoneal (ip) y 0,1 ml de xilacina intramuscular (im). En caso de que el animal mostrara signos de no estar completamente anestesiado antes de finalizar la cirugía, se inyectaron 0,15 ml de ketamina adicional. A continuación, se colocaron los animales en el aparato estereotáxico, se les cortó el pelo y, previa desinfección, se realizó una incisión en la piel de la calota con bisturí. Se removieron las membranas que recubren el cráneo para visualizar el bregma y establecer las coordenadas de inyección (**Fig. 6.1 B**). Una vez marcadas dichas coordenadas, se perforó el cráneo para dejar pasar la aguja (**Fig. 6.1 C**).

Se inyectaron los siguientes adenovirus:

- HD-OSKM a las ratas experimentales. Se utilizó un lote de virus con un título de 1×10^{15} partículas virales/ml, correspondientemente caracterizado.
- RAd-GFP a las ratas control. Se utilizó un lote de virus con un título de 5×10^{11} pfu/ml.

Se introdujo la aguja lentamente y se esperó 5 minutos antes de comenzar a inyectar. Se inyectaron 3 μ l (1 μ l/min) de manera bilateral. Luego de cada inyección, se esperó 5 minutos antes de retirar la aguja para evitar el reflujo de la solución inyectada.

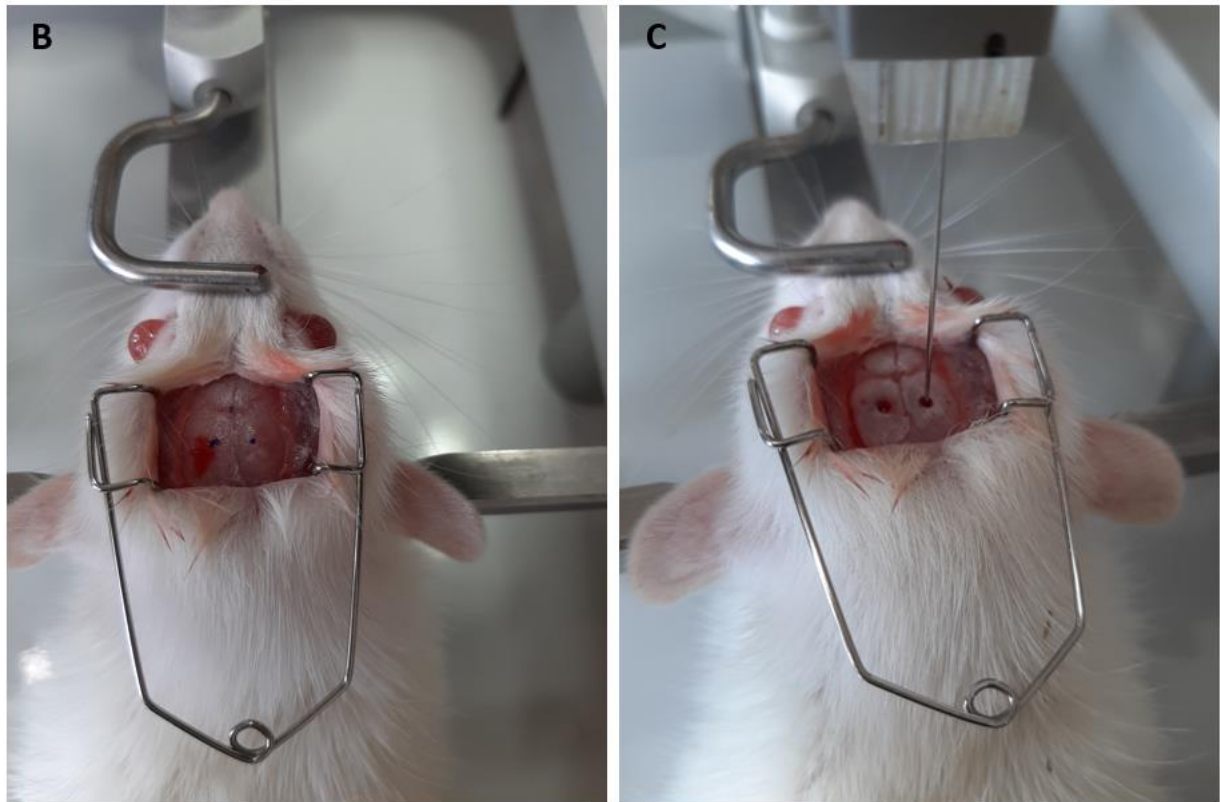
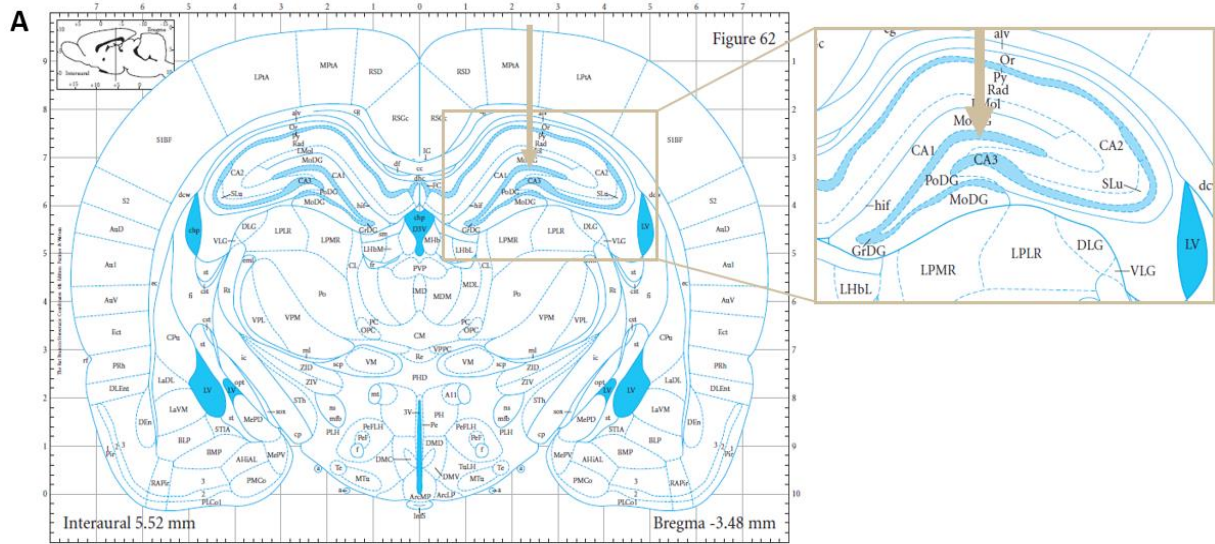


Figura 6.1. Inyección en el hipocampo dorsal. **A)** Corte coronal de cerebro de rata. Esquema perteneciente a Paxinos y Watson, 2007. La flecha muestra la zona de inyección en el hipocampo dorsal. Las coordenadas utilizadas en la cirugía estereotáxica fueron 3,5 mm anteroposterior, \pm 2 mm mediolateral y - 4 mm dorsoventral. **B)** Coordenadas marcadas respecto al bregma luego de remover las membranas. **C)** Se observa cómo ingresa la aguja en las perforaciones realizadas.

6.2.3 Pruebas comportamentales

Todas las ratas se sometieron a los test de reconocimiento espontáneo de localización del objeto (SLR) y Barnes con el objetivo de evaluar el efecto del tratamiento sobre el desempeño cognitivo de las mismas a nivel de memoria de reconocimiento y memoria espacial. Los animales fueron manipulados por los mismos operadores durante 3 días antes de realizar las pruebas. Al iniciar las mismas, los animales fueron trasladados al cuarto de comportamiento y aclimatados durante al menos 1 hora previo a la habituación y prueba. En el caso del Barnes y del SLR, cada rata fue habituada a la cámara de prueba durante 3 y 5 minutos respectivamente los días previos a la prueba.

Test de reconocimiento espontáneo de la localización del objeto (SLR)

Se procedió a realizar la prueba tal como se explica en la sección 4.2.2 de la presente tesis, utilizando las 12 ratas jóvenes, las 10 ratas seniles inyectadas con el vector HD-OSKM y las 12 ratas seniles inyectadas con el vector control.

Test de Barnes

Se utilizaron las 12 ratas jóvenes, las 10 ratas seniles inyectadas con el vector HD-OSKM y las 12 ratas seniles inyectadas con el vector control. Se realizó una versión modificada de la prueba basada en parte en un procedimiento previamente reportado (**Vargas-López et al., 2011**). La plataforma del laberinto de Barnes consiste en un círculo negro de acrílico de 122 cm de diámetro, ubicado a 108 cm del suelo, con 20 agujeros equidistantes de 10 cm de diámetro alrededor de su periferia. Los agujeros se numeran del -9 al 10. El agujero cero – o agujero meta –, está conectado a una caja de escape (removible) del mismo material que la mesa, cuyas dimensiones son de 38,7 cm de largo x 12,1 cm de ancho x 14,2 cm de profundidad. Este agujero se encuentra en una posición fija respecto a cuatro señales visuales, ubicadas a 50 cm de la plataforma circular. Para comenzar la prueba, se coloca a la rata en una cámara que consiste en un cilindro blanco de 20 cm de alto, con la luz apagada. Luego de 30 segundos, se retira el cilindro dejando a la rata libre para explorar la plataforma, y se utilizan un generador de ruido blanco de 90 dB y una bombilla de luz blanca de 500 W para generar un estímulo de escape. El protocolo abreviado que utilizamos consiste en tres días de adquisición de información (AT, del inglés *acquisition trial*) – 2 AT por día, es decir 6 AT – seguidos de un día de prueba (PT, del inglés *probe trial*). La duración de los AT es de 120 segundos a partir de que se retira el cilindro y se enciende el estímulo aversivo (luz y ruido). Si la rata no es capaz de encontrar la caja de escape durante ese tiempo, el operador debe acompañarla hasta la misma e introducirla. Ni bien la rata entra en la caja de escape, el estímulo aversivo se apaga. De este modo, con el avance de los AT, se espera que la rata aprenda dónde está ubicada la caja, guiada por las señales del entorno. Se delimitan dos zonas: el GS (del inglés *goal sector*) 1 y 3, siendo el GS1 la zona del agujero meta y el GS3 la zona que abarca el agujero meta y los dos agujeros contiguos. Para el PT, la caja de escape se retira, y se evalúa el tiempo que la rata tarda en llegar al agujero meta y la frecuencia de errores. Luego de cada ensayo, las superficies y cajas se limpian con alcohol 10 % para eliminar cualquier tipo de señal olfativa. Se considera que la rata explora el agujero cuando mete la cabeza en el mismo de modo que su hocico queda debajo del plano de la mesa. Las actuaciones conductuales se registraron utilizando una cámara de video conectada a una computadora montada a 110 cm por encima de la plataforma. Las actuaciones grabadas en

video de los sujetos se midieron utilizando el software Kinovea v0.7.6 (<http://www.kinovea.org>) e ImageProPlus v5.1 (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MD). Los parámetros que suelen evaluarse son los siguientes:

- Latencia: tiempo en segundos que tarda el animal en entrar a la caja de escape durante un AT o en encontrar el agujero meta durante el PT.
- Errores: número de exploraciones en agujeros diferentes del agujero meta. Cada exploración de un agujero incorrecto se cuenta como error.
- Tiempo en el GS1: tiempo en segundos que pasa la rata en el GS1 durante el PT.
- Frecuencia de exploración en el GS1: número de exploraciones en el agujero meta en el PT.
- Tiempo en el GS3: tiempo en segundos que pasa la rata en el GS3 durante el PT.
- Frecuencia de exploración en el GS3: número de exploraciones en los agujeros -1, 0 y 1 dividido 3 en el PT.

6.2.4 Eutanasia y procesamiento de los cerebros

Una vez finalizado el experimento, se procedió a la eutanasia de las ratas, que fueron colocadas bajo anestesia profunda por inhalación de isofluorano. Se dividieron en dos grupos, uno destinado a pruebas histológicas (6 jóvenes, 7 viejas control y 5 viejas tratadas) y otro destinado a la disección del hipocampo (6 jóvenes, 5 viejas control y 5 viejas tratadas). En el caso del primer grupo, los animales se perfundieron de manera intracardiaca (tal como se explica en la sección 4.2.3), se decapitaron con guillotina y se extrajeron los cerebros. Los mismos fueron almacenados en PFA al 4 % durante toda la noche a 4 °C. Luego fueron pasados a solución criopreservadora (30 % de etilenglicol, 1 % de polivinilpirrolidona, 30 % de sacarosa, en PB 0,1 M, pH 7,4) y conservados a - 20 °C hasta que fueron usados para hacer las correspondientes pruebas inmunohistoquímicas. Para ello se enjuagaron de la solución criopreservadora con PB y se cortaron coronalmente en secciones de 40 µm con vibrátomo (VT1000S; Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania/ Leica Microsystems, Heerbrugg, Switzerland). Se dividieron en 6 series, cada serie conteniendo una de cada seis secciones. De esta manera se obtiene un conjunto de secciones seriadas no contiguas que abarcaban el hipocampo dorsal y la corteza perirrinal (con una separación de 240 µm). En el caso del segundo grupo, simplemente se decapitaron los animales con guillotina y se extrajeron los cerebros. La disección del hipocampo se llevó a cabo como se explica en la sección 5.2.2. Las muestras se almacenaron a - 80 °C hasta que fueron enviadas a la Universidad de California, USA.

6.2.5 Diseño experimental

Las ratas jóvenes fueron sometidas al SLR, que duró 5 días. Una vez finalizada esta prueba, se sometieron al Barnes, que también duró 5 días. El día después de finalizar el Barnes se procedió al sacrificio.

En el caso de las ratas viejas, se tomó como día 0 el día de la inyección del vector (HD-OSKM o RAd-GFP). Se organizaron las ratas en subgrupos, de manera que las inyecciones se realizaron en 4 días consecutivos. Se realizó el SLR en el día +30 de tratamiento y una vez que todos los subgrupos finalizaron esta prueba, se realizó el Barnes, el día +38 de tratamiento. Una vez finalizado el Barnes para todos los subgrupos se procedió al sacrificio de los animales, también en subgrupos, al día +49 de tratamiento (**Fig. 6.2**).

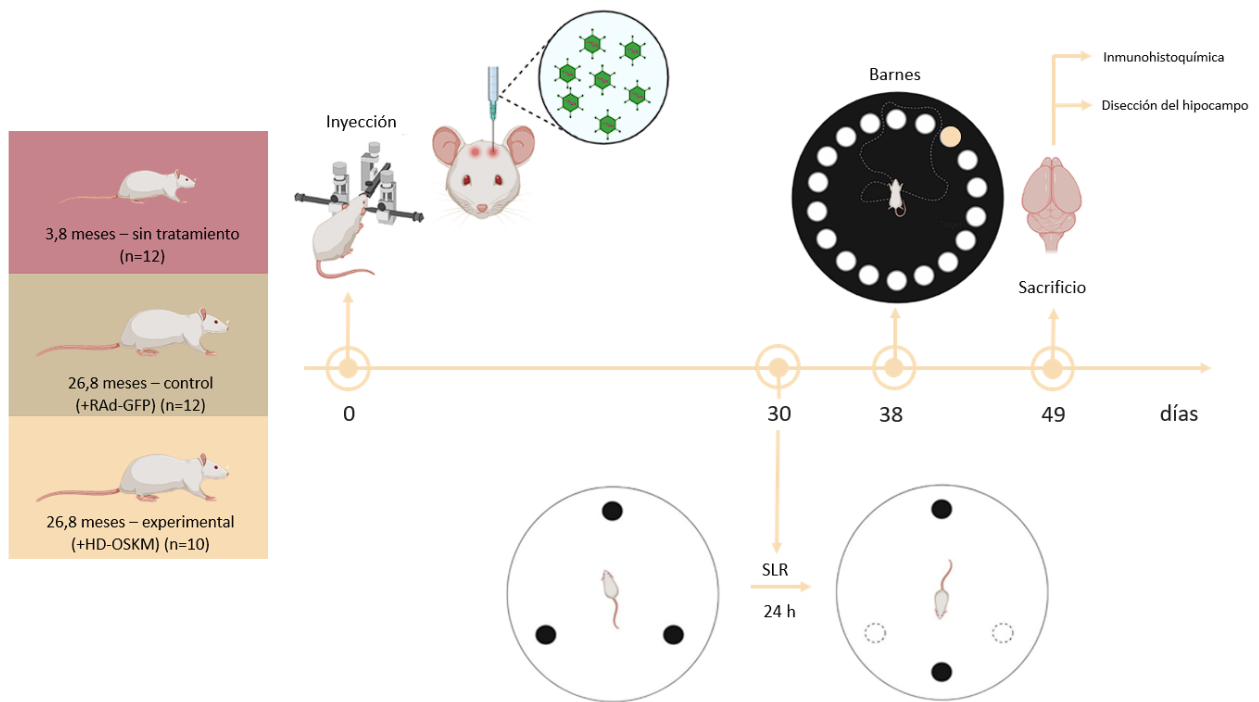


Figura 6.2. Diseño experimental. Se muestra sólo lo realizado con los grupos de ratas envejecidas, contando como día 0 el día que recibieron el vector correspondiente a su grupo. A las ratas jóvenes no se les inyectó nada.

6.2.6 Inmunohistoquímica

Chequeo de expresión de Oct4 en el hipocampo de las ratas inyectadas con el HD-OSKM

Se realizó la técnica con los cortes montados sobre vidrio. Para ello, los cortes de 40 μm se dejaron secar montados por 2 h a 37 $^{\circ}\text{C}$. Se realizó recuperación antigénica con buffer citrato por 15 min a 90 $^{\circ}\text{C}$. Se dejaron enfriar los vidrios en el buffer hasta temperatura ambiente. La peroxidasa endógena se inhibió por goteo de los cortes con H_2O_2 3 %, durante 30 min en cámara húmeda. Luego se procedió al bloqueo de uniones inespecíficas con suero normal de caballo (SNC) 10 % disuelto en solución de lavado, durante 1 h a temperatura ambiente, con una gota por corte. Se incubó con el anticuerpo de conejo anti-Oct4 (dilución 1/200, Cell Signalling, C30A3C1). La incubación se realizó en dos etapas, primero a 16 h a 4 $^{\circ}\text{C}$ y posteriormente 1 h a temperatura ambiente, ambas en cámara húmeda. Seguidamente se incubó con un anticuerpo biotinilado de cabra anti-conejo (dilución 1/300, Vector Laboratories, BA-1000) durante 120 min. Luego se incubó con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (kit ABC, dilución 1/500, Vector Laboratories, PK-6100) durante 45 min y, por último, con la solución de revelado, empleando 3,3-diamino bencidina tetrahidro-cloruro (DAB) como cromógeno (DAB + H_2O_2 al 0,003 % en PB), durante 5 min. Luego de cada paso se realizaron tres lavados de 5 minutos con solución de lavado. Tanto el anticuerpo primario y secundario como el complejo se diluyeron en solución de lavado SNC 3 %. Se sometieron los vidrios a la tinción Nissl (solución de violeta de cresilo al 0,5 % a 37 $^{\circ}\text{C}$, durante 30 seg) para visualizar los puntos de referencia anatómicos.

Evaluación del efecto terapéutico del virus en los cerebros tratados

Para estudiar el efecto del tratamiento con el virus en el hipocampo de las ratas, se analizó la población DCX positiva mediante IHQ revelada con DAB y la sinapsis – a través del marcador presináptico sinaptofisina – mediante IHQ de fluorescencia en los tres grupos de trabajo.

Los anticuerpos primarios utilizados para las marcaciones fueron los siguientes:

- 1) Anticuerpo policlonal de cabra anti-doblecortina (DCX) (marcador de neuroblastos; dilución 1/1000, c-18, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas).
- 2) Anticuerpo policlonal de conejo anti-sinaptofisina (Syn) (marcador presináptico, dilución 1/500, ProteinTech, 17785-I-AP).

Los anticuerpos secundarios utilizados fueron los siguientes:

Para IHQ con DAB:

- 1) Anticuerpo biotinilado de caballo anti-cabra (dilución 1/300, Vector Laboratories, BA-9500).

Para IHQ de fluorescencia:

- 1) Alexa 647 de cabra anti-conejo (dilución 1/300, Invitrogen, F027).

Se realizaron las técnicas de IHQ en secciones de flotación libre. Para cada animal se procesaron conjuntos separados de secciones. En el caso de la IHQ con DAB, se inhibió la peroxidasa endógena con H_2O_2 3 % durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se procedió al bloqueo de uniones inespecíficas con suero normal de caballo (SNC) 10 % disuelto en solución de lavado (PB 0,01 M, tritón 0,03 %) durante 1 h a temperatura ambiente. Se incubó durante toda la noche con el anticuerpo primario a 4 °C, y luego con el anticuerpo secundario durante 120 min. Luego se incubó con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (kit ABC, dilución 1/500, Vector Laboratories, PK-6100) durante 90 min y, por último, con la solución de revelado, empleando 3,3-diamino bencidina tetrahidro-cloruro (DAB) como cromógeno (DAB + H_2O_2 al 0,003 % en PB), durante 5 min. Luego de cada paso se realizaron tres lavados de 5 minutos con solución de lavado. Tanto los anticuerpos primarios y secundarios como el complejo se diluyeron en solución de lavado SNC 3 %. Las secciones se colorearon con la tinción Nissl (solución de violeta de cresilo al 0,5 % a 37 °C durante 15 segundos) para visualizar los puntos de referencia anatómicos. Finalmente, se deshidrataron y se montaron con Bálsamo de Canadá (Biopack).

En el caso de la IHQ de fluorescencia, directamente se utilizó para la detección el anticuerpo secundario. En este caso no es necesaria la inhibición de la peroxidasa endógena ni la tinción con Nissl. Luego de la incubación durante toda la noche con el anticuerpo primario a 4 °C, se incubó con el anticuerpo secundario conjugado a un fluoróforo durante 120 minutos, protegiendo la placa de la luz. Al final del protocolo se hizo una tinción con DAPI con el objetivo de marcar los núcleos celulares. Se montaron con Fluoromount (FisherScientific).

6.2.7 Obtención y análisis de imágenes

Centramos nuestro análisis en el hipocampo dorsal. Analizamos DCX y Syn. Para la toma de imágenes se utilizó, en el caso de DCX, un microscopio Olympus BX-51 conectado a una cámara

de video Olympus DP70 CCD (Tokio, Japón) y en el caso de Syn, un microscopio confocal Olympus FV1000 (Japón). Para el análisis de las imágenes se utilizó el programa ImageProPlus v5.1 (IPP, Media Cybernetics). En el caso de las imágenes tomadas con el microscopio confocal se utilizó además el programa FV10-ASW 4.2 Viewer.

Análisis de neuroblastos

Los neuroblastos se detectaron mediante inmunohistoquímica para DCX en el hipocampo de las ratas. El número de células positivas para DCX se evaluó mediante la técnica de fraccionador óptico modificada (**West, 1993 a**). Las estimaciones individuales del número total de células bilaterales (N) se calcularon de acuerdo con la siguiente fórmula: $N = RQ\Sigma * 1 / ssf * 1 / asf * 1 / tsf$, donde RQΣ es la suma de las células contadas, ssf es la fracción de muestreo de la sección, asf es la fracción de muestreo del área y tsf es la fracción de muestreo del espesor. Debido a que el número de neuronas inmaduras en las ratas seniles no es muy alto, se cuantificaron todas las regiones de la zona subgranular (SGZ) y de la capa celular granular (GCL). Las estimaciones se basan en el conteo de cuerpos celulares DCX inmunorreactivos (DCXir) en cada uno de los campos fotografiados (constituidos por dos imágenes a distinto foco). A su vez se evaluó el diámetro de las células DCXir y la cantidad de células con prolongaciones.

Análisis de botones sinápticos

Los botones presinápticos en el hipocampo de las ratas se marcaron mediante inmunohistoquímica de fluorescencia para sinaptofisina. Se capturaron pilas de imágenes confocales (Z-stack) en la zona CA3 utilizando un objetivo de aumento 20X y zoom 3X, con una profundidad Z de 1,01 μm/plano, utilizando dos canales fluorescentes (para la marcación de Syn y DAPI). Se registró la correspondiente proyección de intensidad máxima en Z. Para poder ver las marcaciones en el IPP se ecualizaron las imágenes, se estableció un criterio umbral y se midió la intensidad promedio de fluorescencia y el área promedio de las zonas marcadas. Se determinó el promedio general de intensidad de fluorescencia y de área inmunorreactiva para cada rata como el promedio de todos los valores obtenidos.

6.2.8 Análisis estadístico

Los datos comportamentales se compilaron y analizaron con el software Sigma Plot v. 11 (San Jose, CA). Para el SLR, se utilizaron mediciones repetidas bidireccionales de ANOVA (Factores edad y objeto como variables independientes) para determinar la preferencia de los objetos en la fase de entrenamiento según la edad. Para la fase de elección, se utilizó el ANOVA de una vía para comparaciones grupales (factor edad como variable independiente) y el t-test de una muestra para evaluar la capacidad de discriminación considerando que la diferencia entre la media de la población muestreada y la media poblacional hipotética es igual a cero (0). Con respecto al test de Barnes, los datos presentaban una distribución no normal. Por ello se sometieron a un análisis estadístico no paramétrico comparando los animales tratados con los animales no tratados, utilizando el test de Mann Whitney.

Los datos estereológicos se analizaron con el test de Student (t-test) para muestras no pareadas, comparando solo el grupo envejecido tratado contra el grupo envejecido control. Las ratas jóvenes se utilizaron a modo de referencia. En el caso de que los datos no superasen el criterio de normalidad o igual variante, se realizó Kruskal-Wallis. Se emplearon pruebas

post-hoc cuando fue apropiado (Holm-Sidak y Dunn). Todos los datos se presentan como media \pm SEM. Los criterios para las diferencias significativas se fijaron en el nivel de probabilidad del 95 %.

6.2.9 Análisis del perfil epigenético

Se analizaron las muestras tal como se explica en la sección 5.2.3 de la presente tesis. De este modo, la extracción de ADN se realizó utilizando una plataforma automatizada de extracción de ácido nucleico llamada QIAcube HT (Qiagen) con un kit de extracción basado en columnas, QIAamp 96 DNA QIAcube HT Kit (Qiagen). Para purificar el ADN genómico, se utilizó el DNeasy Tissue Kit (Qiagen). Sólo las muestras con una relación 260/280 mayor a 2 fueron procesadas (tratamiento con bisulfito). El ADN tratado se analizó utilizando el chip Illumina “Mammalian Methylation Chip 320”, que proporciona mediciones cuantitativas de la metilación del ADN para 320k dinucleótidos CpG, pero sólo alrededor de 100k de estos corresponden al genoma *Rattus norvegicus* (Arneson et al., 2022). Se utilizaron dos relojes de rata: el reloj multi-tejido y el reloj de cerebro, previamente descritos en esta tesis. Se realizó el test de Student (t-test) para buscar diferencias estadísticas entre los grupos.

6.3 Resultados

6.3.1 Expresión del virus en el hipocampo

Se observó, a los 38 días post inyección (en ratas de 2 meses de edad), un porcentaje muy alto de las células de la capa granular y subgranular del DG del hipocampo expresando el virus, con menor expresión en el hilus, así como también se vio expresión en la región CA1 – que no llega a observarse entera en la figura – (Fig. 6.3). Se chequeó en las mismas ratas la expresión de Oct4 por inmunohistoquímica observando los mismos resultados (Fig. 6.4). Por otro lado, se observó buena expresión en el hipocampo de las ratas de 2 meses inyectadas con el vector utilizado como control, también a los 38 días, aunque en este caso, en una menor cantidad de células de la capa granular y subgranular del DG, y nuevamente con menor expresión en el hilus (Fig. 6.5).

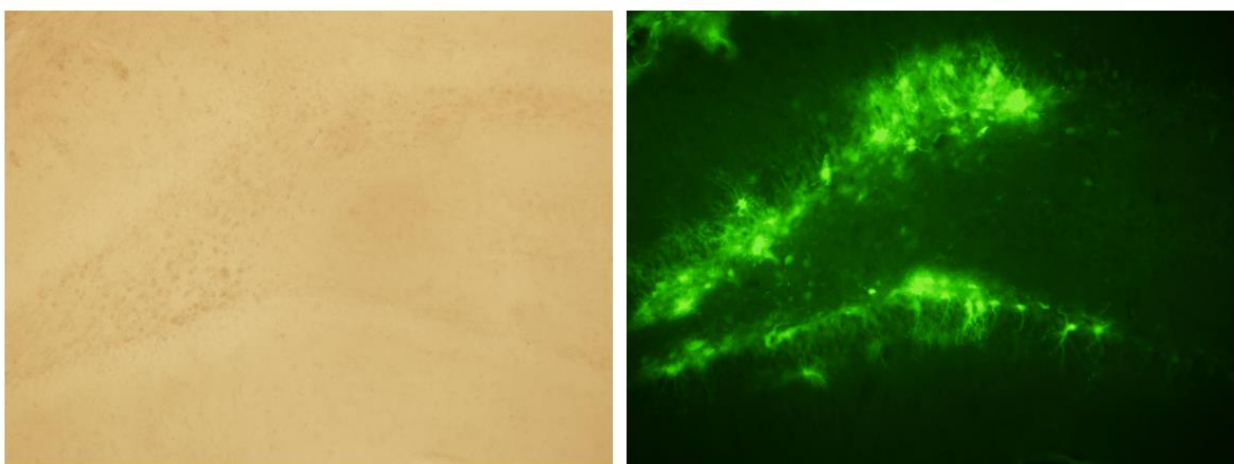


Figura 6.3. Expresión del HD-OSKM en el hipocampo 38 días post inyección.

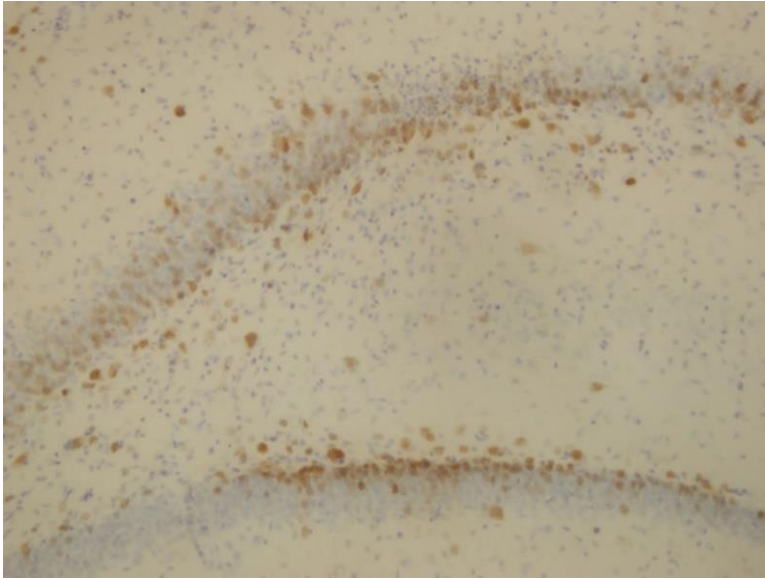


Figura 6.4. Inmunohistoquímica contra Oct4 (marcación marrón) 38 días post inyección.

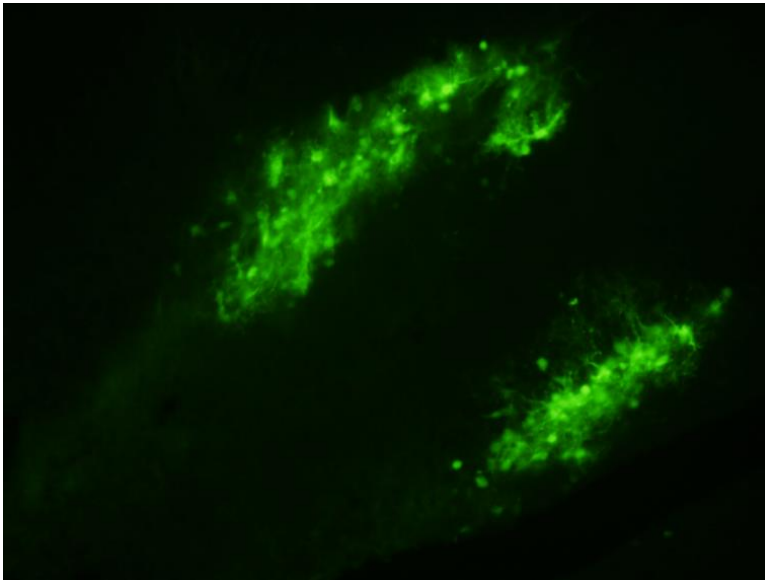


Figura 6.5. Expresión del vector control (Rad-GFP) en el hipocampo 38 días post inyección.

6.3.2 Pruebas comportamentales

Test de reconocimiento espontáneo de la localización del objeto (SLR)

Se utilizó la versión de la prueba explicada en la sección 4.2.2, con una distancia de 20 cm entre la posición novedosa y las dos anteriores. En este caso, las ratas seniles tratadas con el vector no mostraron ninguna diferencia respecto a las ratas seniles control, siendo el desempeño de ambos grupos menos satisfactorio que el del grupo joven, pero sin diferencias significativas con el mismo (índice de discriminación grupo joven $0,2795 \pm 0,0934$; índice de discriminación grupo senil control $0,1034 \pm 0,0625$; índice de discriminación grupo senil OSKM $0,1022 \pm 0,0897$).

Barnes

Para evaluar la capacidad de adquirir la información espacial de los tres grupos de ratas se evaluó el tiempo de latencia de las ratas de cada grupo en cada AT. Además, para ver si este aprendizaje persistía en el tiempo, se midió el tiempo que cada rata pasó en el GS1 y GS3 en el PT. Como era de esperarse, las ratas jóvenes tuvieron un aprendizaje rápido en contraste con las ratas seniles. En el primer AT, las ratas jóvenes mostraron un tiempo de latencia similar al de las ratas envejecidas, pero este tiempo fue haciéndose menor en cada AT. En el caso de los grupos envejecidos, sin embargo, este proceso fue más lento. Se encontró una mejora en el aprendizaje de las ratas tratadas con el HD-OSKM (el test se realizó a los 38 días de tratamiento), reflejada en una diferencia estadísticamente significativa entre el tiempo de latencia de las mismas respecto al tiempo de latencia de las ratas seniles control en los dos últimos AT, el AT5 y AT6, aunque no llegaron a tener un rendimiento similar al del grupo joven (Fig. 6.6). Respecto a los parámetros arrojados por el PT, no se observaron diferencias significativas entre el tiempo que pasaron las ratas tratadas versus las ratas control en el GS1. En el GS3, sin embargo, se observó un acercamiento del comportamiento de las ratas tratadas hacia el comportamiento de las ratas jóvenes, pero la diferencia entre este grupo y el grupo de ratas seniles control no fue significativa (Fig. 6.7).

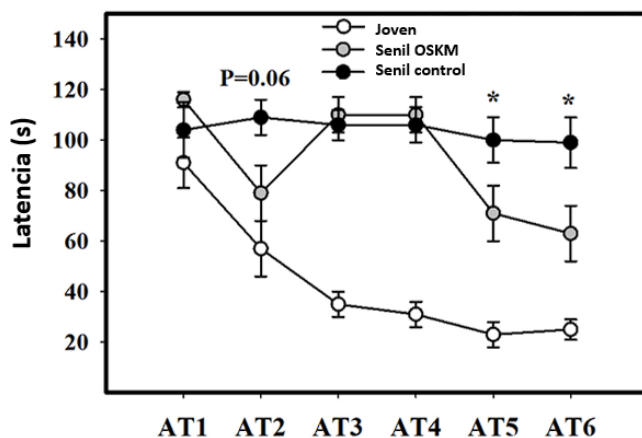


Figura 6.6. Tiempos de latencia en segundos en los seis AT para cada grupo. Se observa una diferencia significativa entre el grupo senil OSKM y el grupo senil control en los últimos ATs.

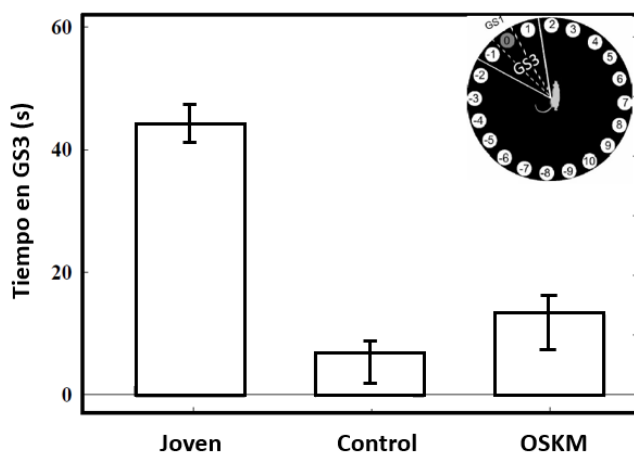


Figura 6.7. Tiempo de permanencia en el GS3 en segundos durante el PT para cada grupo. No se observan diferencias significativas entre los grupos seniles tratado y control.

6.3.3 Análisis de imágenes

Análisis de neuroblastos

No se encontraron diferencias significativas en el número de neuronas inmaduras marcadas con DCX entre el grupo envejecido tratado con el HD-OSKM y el grupo envejecido control ($p=0,533$) (**Fig. 6.8 D**). Tampoco se vio una diferencia significativa en cuanto al diámetro de las mismas entre el grupo tratado y el control, ni en el número de células con prolongaciones.

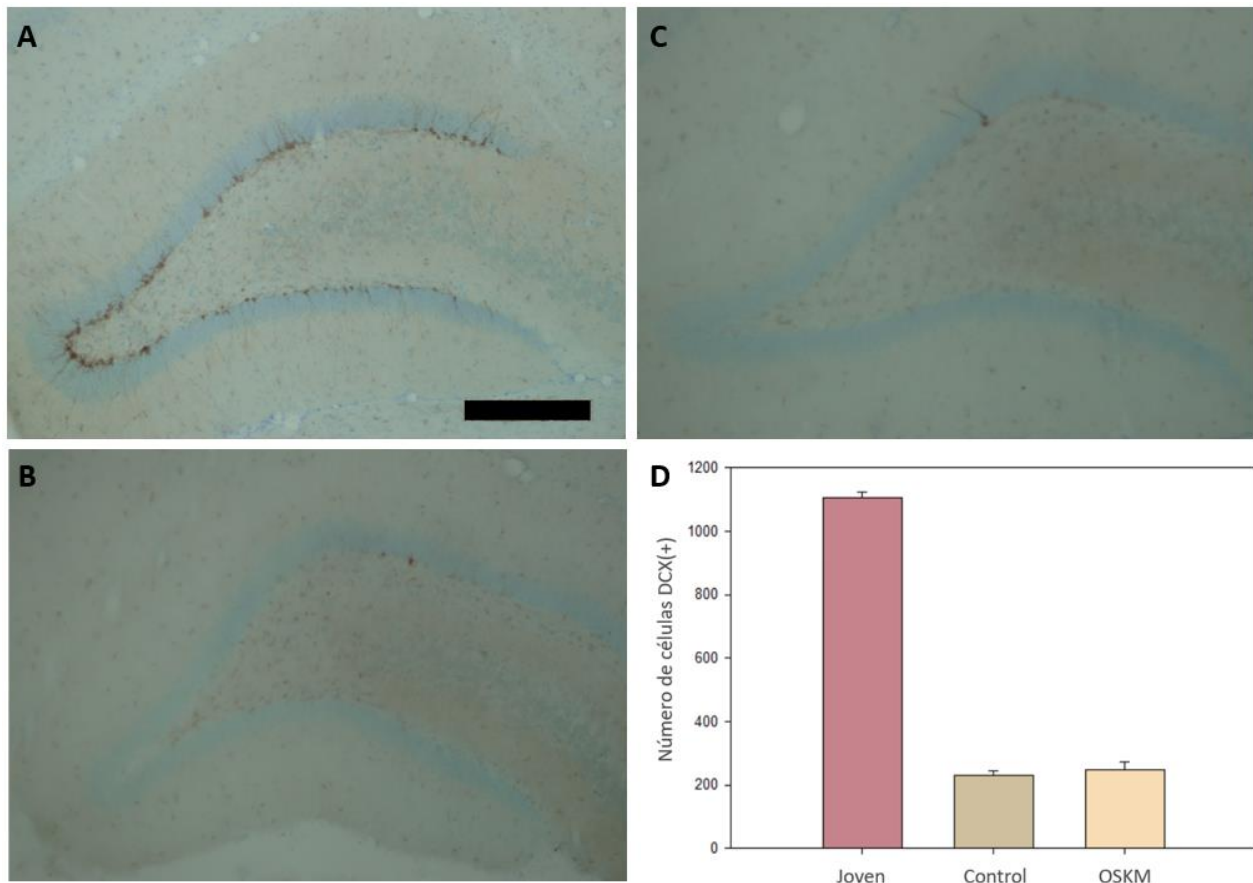


Figura 6.8. Neuroblastos en el giro dentado. **(A – C)** Secciones coronales en representación de cada grupo de animales. Las células teñidas de color marrón corresponden a las células DCX(+). La coloración lila corresponde a la tinción con Nissl. **A)** Grupo joven. **B)** Grupo senil que recibió el vector control. **C)** Grupo senil que recibió el vector HD-OSKM. Escala: 250 μ m. **D)** Número de células DCX(+). Los datos están expresados como promedio \pm SEM.

Análisis de botones sinápticos

En cuanto al análisis de los botones sinápticos en el hipocampo de las ratas, medido a través de la marcación con sinaptofisina, los resultados encontrados mostraron un aumento significativo en la intensidad de fluorescencia de las ratas seniles respecto a la intensidad de fluorescencia del grupo joven ($p < 0,001$). Sin embargo, no se hallaron diferencias significativas entre el grupo senil tratado con HD-OSKM y el grupo senil control ($p=0,971$) (**Fig. 6.9 D**).

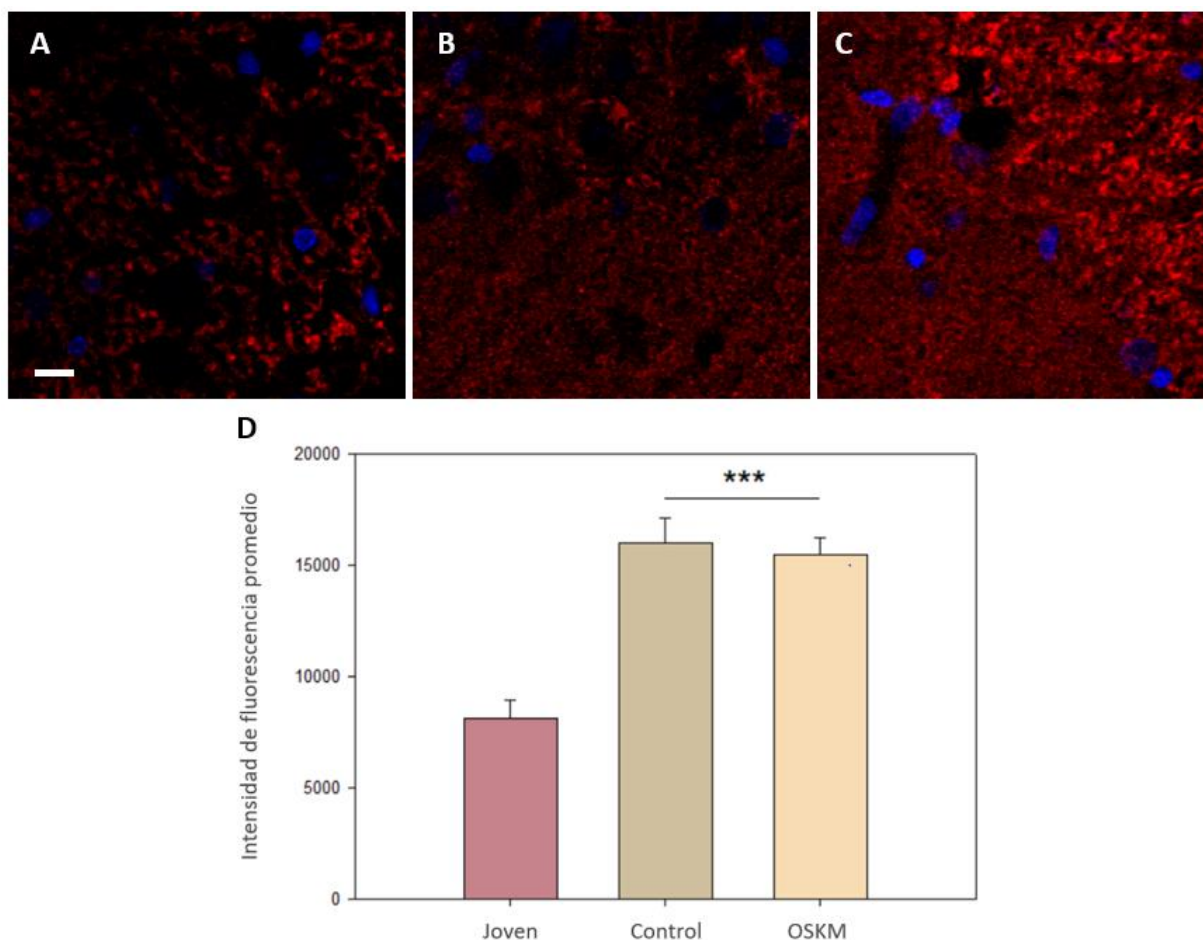


Figura 6.9. Botones sinápticos en la zona CA3 del hipocampo. **(A – C)** Secciones coronales en representación de cada grupo de animales. La marca de la sinaptofisina se observa como fluorescencia roja, mientras que la fluorescencia azul corresponde al DAPI, que marca los núcleos celulares. **A)** Grupo joven. **B)** Grupo senil control. **C)** Grupo senil tratado con HD-OSKM. Escala: 20 μ m. **D)** Intensidad de fluorescencia promedio en los tres grupos en la zona CA3.

6.3.4 Análisis de la metilación del hipocampo

Los dos relojes de rata empleados en este estudio lograron diferenciar entre muestras de hipocampo provenientes de ratas jóvenes y seniles (**Fig. 6.10 A y B**). Sin embargo, cuando limitamos nuestro análisis a muestras de ADN de alta calidad de los hipocampus de ratas seniles (con un tamaño de muestra de 4 controles frente a 5 ratas tratadas con OSKM), la evidencia de rejuvenecimiento epigenético basado en nuestros relojes epigenéticos fue meramente sugestiva. El reloj de cerebro de rata mostró un valor p de 0,08 para el test de Student (**Fig. 6.10 C**), mientras que el reloj multi-tejido mostró un valor p de 0,17 (**Fig. 6.10 D**).

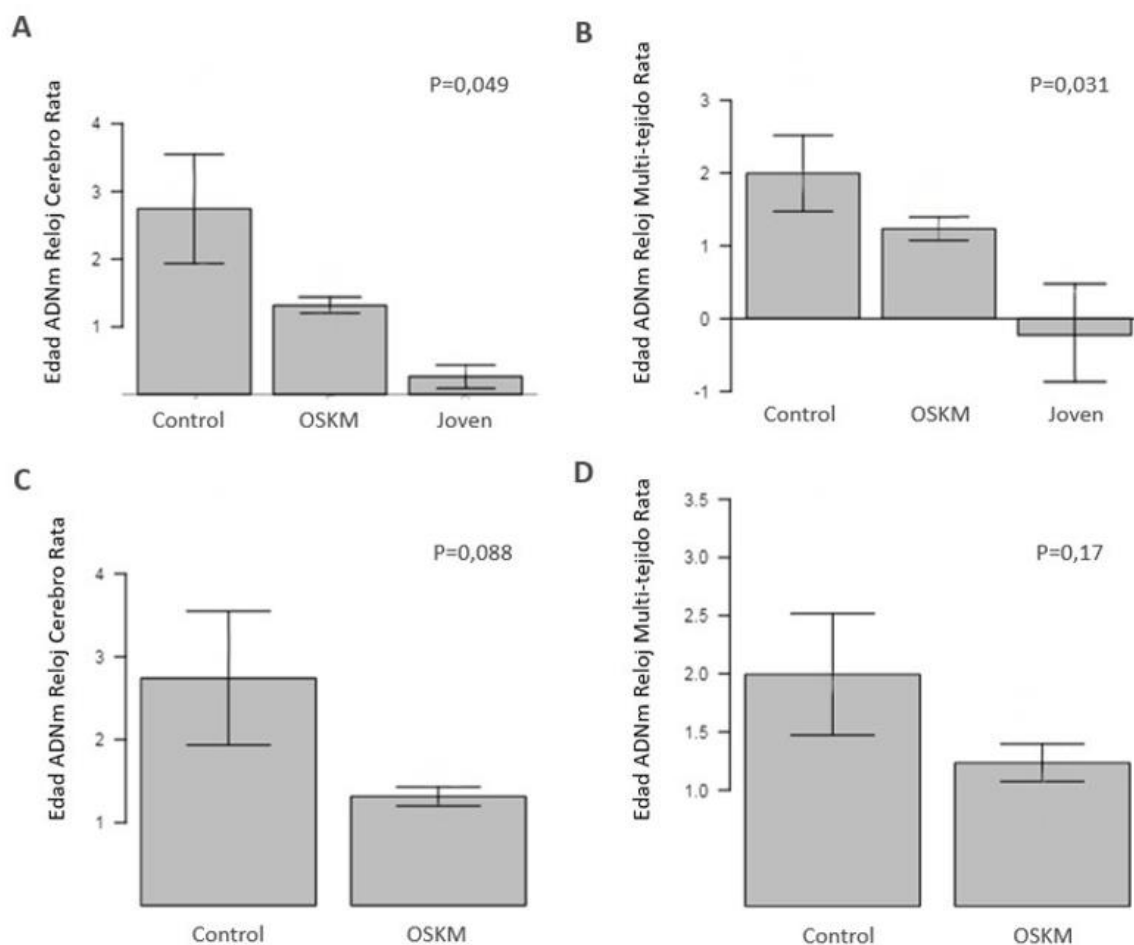


Figura 6.10. Reloj epigenético de cerebro de rata y multi-tejido de rata aplicado a los diferentes grupos experimentales. Se observan diferencias significativas sólo entre las edades epigenéticas de las ratas jóvenes y seniles (A y B), pero no entre las edades epigenéticas de las ratas seniles tratadas y control (C y D).

6.4 Discusión

A lo largo de esta tesis hemos visto que el envejecimiento trae aparejado una pérdida de la función cognitiva, a nivel de la memoria y el aprendizaje. El fin último de este trabajo es revertir, o al menos atenuar, esa pérdida en las ratas envejecidas. Se ha visto que la disminución de las capacidades cognitivas está asociada, entre varios factores, a los cambios que ocurren en el cerebro a nivel de las poblaciones celulares y a nivel de la metilación del ADN. Es por esto que basamos la evaluación de los efectos de la terapia implementada en estudiar los cambios en la neurogénesis que ocurre en el giro dentado, así como los cambios entre las conexiones que se dan entre las neuronas – muy ligado a lo que se ha mencionado previamente como teoría del engrama – y también al análisis de la edad de metilación en el hipocampo de las ratas tratadas versus las ratas control, de modo de poder establecer una correlación entre estos parámetros que permita a su vez determinar cuál es el efecto que está teniendo nuestro vector. Se eligieron como pruebas cognitivas el test de reconocimiento espontáneo de localización del objeto (SLR) y el test de Barnes de modo de abarcar la memoria de reconocimiento además de la memoria espacial de los animales. Como se ha discutido previamente, se utilizó la versión del SLR con mayor categoría de distancia, lo cual ha generado mejores resultados a la hora de realizar el test. También utilizamos una versión modificada del

test de Barnes (**Vargas-López et al., 2011**), que permite evaluar sin mayores dificultades las actuaciones cognitivas de las ratas de edad avanzada. Es importante mencionar en este punto que, si bien no se obtuvo el resultado general que se esperaba, se logró implementar una terapia prolongada mediante la expresión continua de los genes OSKM en las ratas sin causar ningún tipo de efecto adverso. Ya se han hallado efectos positivos de una sobreexposición corta a los genes en ratones transgénicos jóvenes (**Rodríguez-Matellán et al., 2020**) y si bien se han reportado previamente terapias con vectores virales en las que la inducción prolongada cíclica o continua de los genes OSK (**Macip et al., 2023; Lu et al., 2020**) u OSKM (**Wi et al., 2016**) no incrementó la incidencia de tumores ni mostró otros efectos negativos en la salud en general de los animales tratados, este es el primer tratamiento de largo plazo sin efectos negativos secundarios llevado a cabo en el giro dentado. En conjunto, esto demuestra que la utilización de vectores virales para la reprogramación parcial *in vivo* es eficiente y segura. En cuanto a los efectos esperados de esta terapia, se vieron algunas mejoras en el desempeño cognitivo de las ratas tratadas – sólo en cuanto a su aprendizaje a lo largo de los ATs –, pero no se han podido correlacionar con los marcadores estudiados. No se observaron cambios en el grupo de las ratas seniles tratadas respecto a su memoria de reconocimiento ni en cuanto a la memoria espacial a largo plazo. Sin embargo, tal como se mencionó previamente, se vio un aumento en el aprendizaje de las ratas seniles tratadas en comparación a las ratas seniles control, reflejado en una disminución significativa en el tiempo de latencia en los AT5 y AT6. Cabe mencionar que la memoria de reconocimiento se evaluó a los 30 días de sobreexpresión de los genes OSKM, mientras que la memoria espacial se evaluó a los 38 días de tratamiento. Probablemente haga falta un tratamiento más prolongado para ver un mayor efecto de la terapia. Por otro lado, hemos visto en esta misma tesis que el déficit cognitivo relacionado a la memoria espacial en las ratas hembra SD aparece en una etapa más temprana (desarrollado en el capítulo IV), de modo que sería interesante probar esta misma terapia en ratas de mediana edad y observar si se logran cambios en otros parámetros o los mismos cambios – quizás a mayor escala – que cuando se empieza a tratar al animal en una edad avanzada. Proponemos entonces que la sobreexpresión ectópica de los genes en el giro dentado durante 38 días en ratas seniles fue suficiente para mejorar el aprendizaje de los animales pero no para mantener ese aprendizaje en el tiempo. Esto podría estar relacionado a las neuronas involucradas en el almacenamiento del recuerdo que se genera durante el test, de modo que quizás la información se está almacenando correctamente y se puede recuperar en un período corto de tiempo como es el transcurrido entre el AT5 y AT6 (las neuronas que se activaron permanecen activas), pero no a largo plazo debido a una reactivación insuficiente de dichas neuronas (aunque el comportamiento de las ratas seniles tratadas se acercó un poco más al comportamiento de las ratas jóvenes). Esto a su vez está íntimamente ligado a que las neuronas presentes en el giro dentado de las ratas seniles son en su mayoría neuronas envejecidas, con un potencial excitatorio disminuido. Hemos reportado en estudios previos que la disminución de la neurogénesis en el hipocampo de las ratas envejecidas tiene una correlación con el deterioro cognitivo en la memoria espacial de los animales (**Canatelli Mallat et al., 2022**). En el estudio abordado en este capítulo, las ratas fueron sacrificadas luego de 49 días de sobreexpresión de los genes OSKM. Al evaluar la neurogénesis de las ratas tratadas, no se hallaron diferencias significativas respecto al grupo envejecido control. Esto se condice con resultados informados previamente en ratones transgénicos (**Rodríguez-Matellán et al.,**

2020), en los cuales se probó un protocolo de 12 días de inducción continua y un protocolo de 4 meses de inducción cíclica (3 días de inducción y 4 días de descanso) de los genes OSKM, sin obtener cambios significativos en la población de células DCX positivas en ninguno de los casos. Se estudió también la sinapsis entre las neuronas del hipocampo a través del marcador presináptico sinaptofisina, pero nuevamente, no encontramos diferencias significativas entre las ratas seniles tratadas y las ratas seniles control. Lo que sí se encontró fue que los niveles de sinaptofisina eran significativamente mayores en las ratas envejecidas que en las ratas del grupo joven. Si bien la pérdida de sinapsis asociada al envejecimiento está presuntamente ligada a los cambios cognitivos observados durante el mismo y las enfermedades neurodegenerativas (**Sze et al., 1997; Terry et al., 1991**), se han reportado estudios en los cuales no se observaron cambios en los niveles de sinaptofisina en hipocampo de ratas (**Calhoun et al., 1998; Rapp y Gallagher, 1996; Rasmussen et al., 1996**) ni de humanos (**West, 1993 b**). También se ha encontrado una caída selectiva del número de terminales presinápticas inmunorreactivas en la corteza frontoparietal de ratas envejecidas correlacionada a un déficit del aprendizaje, pero no en la capa molecular del hipocampo (**Chen et al., 1995**). En 2006 se realizó un estudio en humanos, tomando 4 grupos etarios (infantes, adolescentes, adultos y adultos mayores). En línea con nuestro hallazgo, dicho estudio mostró que los niveles de sinaptofisina son menores en la infancia, pero no difieren significativamente entre grupos de edad más avanzada, excepto en el hipocampo, donde el aumento de dichos niveles se retrasa hasta la adultez (**Eastwood et al., 2006**). Podríamos hipotetizar que los niveles de esta proteína aumentan hacia la adultez en cada terminal sináptica para compensar la pérdida de cantidad de sinapsis. De ser así, esta técnica podría no ser adecuada para medir sinapsis. Sin embargo, la inferencia de que la abundancia de sinaptofisina refleja la densidad sináptica parece estar justificada, al menos como aproximación, en una serie de estudios en los que ambas se han medido en paralelo (**Davies et al., 2003; Scheff y Price, 2003; Ulupinar y Yucel, 2005**). A su vez, la correlación de la inmunohistoquímica con los botones sinápticos está demostrada (**Walaas et al., 1988; Calhoun et al., 1996**). Existen distintos tipos de botones sinápticos. Dado que la sinaptofisina es una proteína presináptica, vale la pena mencionar que existen botones presinápticos que se conectan a más de una dendrita/espina dendrítica (MSBs, del inglés *multiple-synapse boutons*), otros que se conectan a una sola dendrita/espina (SSBs, del inglés *single-synapse boutons*) y otros sin conexiones aparentes (NSBs, del inglés *non-synapse boutons*). Es probable que, con la edad, algunos MSBs se conviertan en SSBs y algunos SSBs en NSBs. En un estudio realizado en monos hembra se midió, mediante microscopía electrónica, la frecuencia de estos tipos de botones sinápticos, y se encontró que el grupo de edad más avanzada tenía el doble de NSBs que el grupo joven, y que la cantidad de NSBs se correlacionaba inversamente con el desempeño cognitivo de los animales (**Hara et al., 2011**). En base a esta evidencia, podríamos inferir que, en realidad, más allá de los mayores niveles de proteína presináptica en las ratas de edad avanzada, hay un deterioro en las conexiones sinápticas estables en el cerebro envejecido de los animales que está ligado al deterioro cognitivo de dichos individuos.

Dado que el tratamiento no está generando cambios ni en la neurogénesis ni en la sinapsis de las ratas, nos inclinamos por pensar que el relativamente poco tiempo de sobreexposición a los genes en el hipocampo fue suficiente para iniciar un proceso de reprogramación parcial,

pero no para inducir cambios evidentes en las poblaciones neuronales o en sus conexiones, basándonos en estudios en los que se ha demostrado un efecto regenerativo de la terapia *in vivo*, con una exposición parcial o continua bastante más prolongada de los genes (**Macip et al., 2023; Lu et al., 2020**). También hay otros detalles para tener en cuenta. Por ejemplo, en el trabajo de Lu en el que se logró obtener regeneración axonal en un modelo murino de glaucoma, lo que se hizo fue inyectar tres vectores por separado, cada uno con uno de los genes OSK. Al tratar ratones envejecidos naturalmente con un único vector que posee un cassette con los tres genes OSK, sin embargo, no se observó dicho efecto regenerativo, lo cual puede llevar a pensar que la expresión del cassette en sí no es suficiente para la regeneración. Otra posibilidad sería que los efectos buscados en la terapia aplicada en el presente capítulo no se puedan lograr en animales con un deterioro tan avanzado. Se ha reportado previamente una terapia regenerativa exitosa en ratones de 11 meses, mientras que al aplicar la misma terapia a ratones de 18 meses no fue posible obtener el mismo efecto (**Lu et al., 2020**).

La mejora del desempeño cognitivo en las ratas tratadas con nuestro vector HD-OSKM en conjunto con los resultados de los trabajos mencionados previamente en la discusión indican que la expresión continua de los genes de pluripotencia OSKM mediante el uso de vectores virales tiene un efecto regenerativo. En el caso de nuestro tratamiento, el tiempo de expresión permitió mejorar el aprendizaje de las ratas, pero no fue suficiente para inducir cambios en la neurogénesis ni en la conexión de las neuronas de las ratas tratadas. De este modo, no es posible correlacionar la mejora observada con estos factores. Por otro lado, en cuanto al perfil epigenético de los hipocampos tratados, hemos obtenido resultados que muestran una edad epigenética levemente menor, pero no hemos observado diferencias significativas en los resultados arrojados por el reloj multi-tejido ni por el reloj específico de cerebro. Esta leve disminución observada se alinea con lo planteado anteriormente acerca de probar una terapia más prolongada o a más temprana edad (mediana edad), dado que existe una multitud de otros estudios que han reportado signos de rejuvenecimiento epigenético en células y tejidos humanos y de ratón después de la aplicación de OSKM u OSK (**Olova et al., 2019; Sarkar et al., 2020; Simpson et al., 2021; Browder et al., 2022**). Nuestra investigación usando relojes epigenéticos podría verse algo limitada, en este caso particular, por el tamaño de la muestra, dado que al limitar el análisis a las muestras consideradas de calidad, el n de cada grupo se redujo abruptamente. Sin embargo, estos relojes epigenéticos, entrenados con datos independientes, fueron previamente evaluados y se destacan por su precisión. Cabe señalar que de antemano se esperaba que sólo una pequeña proporción de las células del hipocampo fueran transducidas por nuestro vector OSKM y por lo tanto rejuvenecidas directamente. Esas pocas células que expresan los genes OSKM pueden haber generado un ambiente rejuvenecedor en el tejido hipocampal, contribuyendo a reducir ligeramente la edad epigenética de toda la región. La mejora cognitiva observada podría deberse entonces a cambios en el entorno hipocampal desencadenados por la terapia pero que no pueden evidenciarse mediante los marcadores estudiados. Se tendrán en cuenta, para futuros experimentos, marcadores de otras poblaciones, por ejemplo, glía.

6.5 Conclusiones

- La expresión ectópica de los genes OSKM en el giro dentado de la rata hembra SD envejecida durante un período de 49 días no genera tumores ni otros efectos adversos, demostrando que esta estrategia terapéutica es segura.
- La expresión de los genes durante 30 días no es suficiente para mejorar la memoria de reconocimiento de las ratas envejecidas.
- La expresión de los genes durante 38 días permite observar una mejora en el aprendizaje de las ratas, pero no una mejora en la memoria a largo plazo.
- No hemos encontrado un efecto de los genes OSKM a nivel celular en los parámetros evaluados, de modo que la mejora en el desempeño cognitivo de las ratas envejecidas tratadas no se debe a un aumento en la neurogénesis ni en las conexiones entre las neuronas. Tampoco podemos asociar dicha mejora a cambios en el estado de metilación del hipocampo.

Capítulo VII: Criopreservación de los cerebros

7.1 Objetivo específico

Poner a punto un nuevo método de criopreservación derivado de la criogenia que nos permita conservar los cerebros de rata por un período más prolongado y así mantener las células neurales y sus conexiones óptimas para su análisis a fin de obtener mayor reproducibilidad en nuestros ensayos de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.

7.2 Materiales y métodos

7.2.1 Animales

Para los experimentos de criopreservación se utilizaron ratas SD jóvenes (5 meses). Se tomaron 3 grupos experimentales de ratas: un grupo control (n=2; C1 y C2), un grupo estándar (n=3; S1, S2 y S3) y un grupo experimental (n=3; E1, E2 y E3). Esto se definió así porque para cumplir con el objetivo planteado en este capítulo, comparamos el procedimiento estándar utilizado en los centros de criónica para la vitrificación de los cerebros de pacientes, que nombramos con “S” de “standard” para diferenciarlo del protocolo experimental (“E”), que es aquel que se aproxima al que consideramos necesario emplear en condiciones adversas y que no ha sido evaluado previamente.

Los animales fueron mantenidos en una habitación con temperatura controlada (22 ± 3 °C), con ciclos de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad (luces de 7 am a 7 pm), con agua y alimento disponibles *ad libitum*. Los protocolos animales fueron éticamente evaluados y aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la FCM, UNLP (A5647-01).

7.2.2 Soluciones para la perfusión

Las soluciones de perfusión utilizadas para el grupo control fueron las siguientes:

- Buffer fosfato (PB) 0,01 M. Almacenado a temperatura ambiente.
- Paraformaldehído (PFA) al 4 % (pH 7,4 – fijador). Almacenado a 4 °C.

Las soluciones utilizadas para la perfusión del grupo estándar fueron aquellas utilizadas por el Instituto de Criónica de Michigan:

- Solución “carrier”: 0,028 M KCl + 0,23 M glucosa + 0,01 M Tris base (pH 6,8). Almacenada a 4 °C.
- Solución de EG al 10 % p/p: 10 % de etilenglicol (EG) en KCl 0,028 M + glucosa 0,23 M + base de Tris 0,01 M (pH 6,8). Almacenada a 4 °C.
- Solución de EG al 30 % p/p: 30 % de EG en KCl 0,028 M + glucosa 0,23 M + base de Tris 0,01 M. Almacenada a 4 °C.
- Solución de EG al 70 % p/p: 70 % de EG + 31,8 % (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO) + 0,028 M de KCl + 0,23 M de glucosa + 0,01 M de Tris base. Almacenada a - 20 °C.

Las soluciones de criopreservación/vitrificación, utilizadas para la perfusión del grupo experimental, fueron las siguientes:

- Solución salina: NaCl (solución salina) estéril al 0,9 % (p/v). Almacenada a 4 °C.

- Solución de DMSO y glicerol: DMSO al 13 % (v/v) + glicerol al 13 % (v/v) en solución salina. Almacenada a - 20 °C.

7.2.3 Perfusión y procesamiento de los cerebros

Los animales fueron colocados bajo anestesia profunda por inhalación de isofluorano. Para los grupos estándar y experimental, se realizó una perforación en el centro de la calota (5 mm antes del bregma) de una de las ratas (S1 para el grupo estándar, E1 para el grupo experimental) para introducir un termómetro, a fin de monitorear la temperatura del cerebro durante la perfusión a una profundidad de 1 mm, al nivel de la capa neuronal cortical más profunda (**Paxinos y Watson, 2007**). Posteriormente los animales fueron perfundidos de manera intracardiaca. Para ello se realizó una incisión a la altura del esternón para poder cortar el diafragma y las costillas en la unión costocondral, de manera de dejar el corazón expuesto. A continuación se canuló la arteria aorta con una aguja de punta roma a través del ventrículo izquierdo y se realizó un corte en la aurícula derecha con el fin de permitir el drenaje del sistema vascular al final del circuito. Se insertó una aguja de 21 G en el ventrículo derecho para recoger la fracción efluente. En el caso del grupo control, la perfusión se realizó pasando 100 ml de PB seguidos de 250 ml de PFA al 4 %. Para los otros grupos, las perfusiones se realizaron manteniendo las soluciones y la cabeza del animal en hielo. Para el grupo estándar, se pasaron 100 ml de solución carrier, 100 ml de solución de EG al 10 %, luego 100 ml de la solución de EG al 30 % y finalmente 150 ml de la solución de EG al 70 %. El grupo experimental se perfundió con 50 ml de PB. Luego se detuvo la bomba durante 5 h (tiempo en el cual la cabeza continuó cubierta de hielo). Pasadas las 5 h, se encendió la bomba y se pasaron 100 ml de solución salina seguidos de 150 ml de la solución de DMSO 13 % – glicerol 13 % en PB. A todos los animales se les clameó la aorta abdominal para restringir la perfusión a la cabeza y a las regiones torácica y braquial. La velocidad de la bomba peristáltica se fijó en 13 ml/min. Una vez completado el proceso, los animales se decapitaron con guillotina y los cerebros se extrajeron cuidadosamente, se midieron y se pesaron. En el caso de los animales control, los cerebros fueron almacenados en PFA al 4 % durante toda la noche a 4 °C. Luego fueron pasados a solución criopreservadora (30 % de etilenglicol, 1 % de polivinilpirrolidona, 30 % de sacarosa, en PB 0,1 M, pH 7,4) y conservados a - 20 °C hasta que fueron usados para hacer las correspondientes pruebas inmunohistoquímicas. Para los animales de los grupos estándar y experimental, se guardaron los cerebros 2 h a - 20 °C y luego se pasaron a - 80 °C envueltos en papel aluminio. Antes de ser procesados, se llevaron a temperatura ambiente gradualmente (recalentamiento) y se colocaron 24 h en PFA 4 % a 4 °C. Luego se enjuagaron de la solución criopreservadora con PB y se cortaron coronalmente en secciones de 40 µm con vibrátomo (VT1000S; Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania/ Leica Microsystems, Heerbrugg, Switzerland).

7.2.4 Medición del índice de refracción del efluente

Se midió el índice de refracción mediante un refractómetro digital (0-85 BRX MILWAUKEE MA871) para verificar que al final de cada paso de perfusión el efluente recogido tuviera el índice de refracción de la solución de perfusión pura correspondiente, garantizando así el lavado completo de los fluidos anteriores. Se utilizaron como referencia agua destilada (cero) y una solución de sacarosa de concentración conocida. Las medidas arrojadas por el refractómetro estaban en grados Brix. La escala Brix se utiliza para medir el contenido de

sacarosa en agua. Se utilizó un conversor en línea (<https://www.brewersfriend.com/brix-converter/>) para pasar esas unidades a unidades de densidad (g/ml).

7.2.5 Inmunohistoquímica

Se evaluaron algunos marcadores de poblaciones neuronales y de sinapsis en los tres grupos de trabajo. Se analizaron DCX y NeuN por IHQ revelada con DAB y sinaptofisina por IHQ de fluorescencia.

Los anticuerpos primarios utilizados para las marcaciones fueron los siguientes:

- 1) Anticuerpo policlonal de cabra anti-doblecortina (DCX) (marcador de neuroblastos; dilución 1/1000, c-18, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas).
- 2) Anticuerpo monoclonal de ratón anti-NeuN (marcador de núcleos celulares neuronales, dilución 1/500, Millipore, MAB377).
- 3) Anticuerpo policlonal de conejo anti-sinaptofisina (Syn) (marcador presináptico, dilución 1/500, ProteinTech, 17785-I-AP).

Los anticuerpos secundarios utilizados fueron los siguientes:

Para IHQ con DAB:

- 1) Anticuerpo biotinilado de caballo anti-cabra (dilución 1/300, Vector Laboratories, BA-9500).
- 2) Anticuerpo de caballo anti-ratón (dilución 1/300, Vector Laboratories, BA-2000).

Para IHQ de fluorescencia:

- 1) Alexa 488 de burro anti-conejo (dilución 1/300, Jackson, F003).

Se realizaron las técnicas de IHQ en secciones de flotación libre. Para cada animal se procesaron conjuntos separados de secciones. En el caso de la IHQ con DAB, se inhibió la peroxidasa endógena con H₂O₂ 3 % durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se procedió al bloqueo de uniones inespecíficas con suero normal de caballo (SNC) 10 % disuelto en solución de lavado (PB 0,01 M, tritón 0,03 %) durante 1 h a temperatura ambiente. Se incubó durante toda la noche con el anticuerpo primario a 4 °C, y luego con el anticuerpo secundario, según corresponda, durante 120 min. Luego se incubó con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (kit ABC, dilución 1/500, Vector Laboratories, PK-6100) durante 90 min y, por último, con la solución de revelado, empleando 3,3-diamino bencidina tretrahidro-cloruro (DAB) como cromógeno (DAB + H₂O₂ al 0,003 % en PB), durante 5 min. Luego de cada paso se realizaron tres lavados de 5 minutos con solución de lavado. Tanto los anticuerpos primarios y secundarios como el complejo se diluyeron en solución de lavado SNC 3 %. Las secciones se colorearon con la tinción Nissl (solución de violeta de cresilo al 0,5 % a 37 °C durante 15 segundos) para visualizar los puntos de referencia anatómicos. Finalmente, se deshidrataron y se montaron con Bálsamo de Canadá (Biopack).

En el caso de la IHQ de fluorescencia, directamente se utilizó para la detección el anticuerpo secundario. En este caso no es necesaria la inhibición de la peroxidasa endógena ni la tinción con Nissl. Luego de la incubación durante toda la noche con el anticuerpo primario a 4 °C, se incubó con el anticuerpo secundario conjugado a un fluoróforo durante 120 minutos,

protegiendo la placa de la luz. Al final del protocolo se hizo una tinción con DAPI con el objetivo de marcar los núcleos celulares. Se montaron con Fluoromount (FisherScientific).

7.2.6 Obtención y análisis de imágenes

Centramos nuestro análisis en el hipocampo dorsal y la corteza. Analizamos DCX, NeuN y Syn. Para la toma de imágenes se utilizó, en el caso de DCX y NeuN, un microscopio Olympus BX-51 conectado a una cámara de video Olympus DP70 CCD (Tokio, Japón) y en el caso de Syn, un microscopio confocal Olympus FV1000 (Japón). Para el análisis de las imágenes se utilizó el programa ImageProPlus v5.1 (IPP, Media Cybernetics).

Espesor de la corteza y del hipocampo

Para evaluar el espesor de la corteza y el hipocampo, se tomaron muestras de tres secciones no contiguas de la inmunohistoquímica para NeuN, cada 240 μm a lo largo del eje anterior-posterior correspondiente a Bregma (**Paxinos y Watson, 2007**). El espesor de la región de corteza se midió en tres zonas seleccionadas (corteza primaria retrosplenial, motora y somatosensorial) utilizando la herramienta de medición manual del IPP. El espesor de la región del hipocampo se midió desde el punto de inflexión de la región CA1 hasta la parte ventral de las células granulares del giro dentado (DG) utilizando la misma herramienta.

Análisis de neuronas maduras

Las neuronas maduras fueron detectadas como células NeuN inmunorreactivas (NeuNir) en la corteza cerebral. Se determinó el número y el diámetro de las células en la corteza motora primaria y secundaria (**Paxinos y Watson, 2007**) utilizando la herramienta de medición manual del IPP. El diámetro de las células se midió con la herramienta de medición manual del IPP en un mínimo de 30 núcleos por sección.

Análisis de neuroblastos

Las neuronas inmaduras se identificaron como células inmunorreactivas de doble cortina (DCXir) en el DG del hipocampo. El número de células DCXir se estimó mediante una versión modificada del método del disector óptico (**West, 1993 a**). Las estimaciones individuales del número total de células bilaterales (N) se calcularon de acuerdo con la siguiente fórmula: $N = RQ\Sigma * 1 / ssf * 1 / asf * 1 / tsf$, donde RQ Σ es la suma de las células contadas, ssf es la fracción de muestreo de la sección, asf es la fracción de muestreo del área y tsf es la fracción de muestreo del espesor. Las estimaciones se basan en el conteo de cuerpos celulares DCX inmunorreactivos (DCXir) en cada uno de los campos fotografiados (constituidos por dos imágenes a distinto foco). También se midió el diámetro de las células DCXir, utilizando la herramienta de medición manual del IPP.

Análisis de botones sinápticos

Se capturaron pilas de imágenes confocales (Z-stack) en CA3 utilizando un objetivo de aumento 20X y zoom 3X, con una profundidad Z de 1,01 μm /plano, utilizando dos canales fluorescentes (para la marcación de Syn y DAPI). Se registró la correspondiente proyección de intensidad máxima en Z.

Análisis estadístico

Se analizó la distribución de las muestras a fin de determinar el método estadístico a utilizar. Se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) para evaluar las diferencias entre grupos. Se eligió

el método de Tukey como prueba post-hoc. Se consideraron las diferencias como significativas a valores de $p < 0,05$.

7.3 Resultados

7.3.1 Temperatura de los cerebros durante la perfusión

Se registró la temperatura del cerebro de una rata del grupo estándar y una rata del grupo experimental, cada 5 minutos. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 7.1. Se puede ver que la corteza cerebral alcanzó niveles de temperatura más bajos durante las 5 horas de espera del grupo experimental, lo cual indica que durante ese período la temperatura siguió cayendo constantemente.

	S1	E1
Tiempo (min)	Temperatura (°C)	
-5	36,3	36,8
0	33,1	35,1
5	29,8	27,6
10	25,2	23,9
15	22,3	20,6
20	20,2	3,6
25	18,8	5,6
30	17,8	7,1
35	17,2	7,1
40	16,7	7,0
45	16,5	7,3
50	15,6	7,4
55	15,2	7,7
60	14,1	8,5
65	13,6	8,6

Tabla 7.1. Datos de temperatura durante la perfusión. Entre el minuto 15 y 20 de perfusión, en el caso del animal perteneciente al grupo experimental, la bomba de perfusión estuvo frenada durante 5 horas. Al reiniciar el proceso, la temperatura era de 3,6 °C.

7.3.2 Índice de refracción del efluente

Para calibrar el equipo se utilizó agua destilada (cero) y una solución de sacarosa de concentración conocida. El índice de refracción de la misma junto con el de las soluciones utilizadas para la perfusión se muestran en la siguiente tabla:

Solución	°Bx	g/ml
Sacarosa 20 % p/p	19,95	1,0828
Carrier	39,2	1,1749
EG 10 %	12,1	1,0488
EG 30 %	21,5	1,0897
EG 70 %	55,9	1,2669
Salina	1,3	1,0050
DMSO/glicerol	23,9	1,1006

Tabla 7.2. Índices de refracción de la solución de sacarosa 20 % p/p y de las soluciones utilizadas en la perfusión de los animales del grupo estándar y experimental.

Los resultados obtenidos de las mediciones del índice de refracción de los efluentes confirmaron una perfusión satisfactoria en todas las ratas (índices muy próximos a la solución que estaba pasando en ese momento). Estos resultados se muestran en la siguiente tabla:

Rata	S1		S2		S3		E1		E2		E3	
Tiempo (min)	°Bx	g/ml	°Bx	g/ml	°Bx	g/ml	°Bx	g/ml	°Bx	g/ml	°Bx	g/ml
0	33,3	1,1452	38,8	1,1728	37,7	1,1672	2,2	1,0086	No se pudo medir	-	No se pudo medir	-
10	38,0	1,1688	38,8	1,1728	38,0	1,1688	1,1	1,0043	1,1	1,0043	1,5	1,0058
20	23,8	1,1001	14,3	1,0581	37,9	1,1682	1,1	1,0043	1,2	1,0047	1,2	1,0047
30	12,3	1,0496	11,6	1,0467	9,2	1,0367	1,2	1,0047	1,6	1,0062	1,9	1,0074
40	25,0	1,1057	21,2	1,0884	11,2	1,0450	22,0	1,0920	15,8	1,0646	20,6	1,0857
50	53,5	1,2529	22,5	1,0942	21,5	1,0897	23,0	1,0965	22,4	1,0938	22,6	1,0947
60	54,4	1,2581	53,9	1,2552	42,8	1,1937	22,8	1,0956	21,8	1,0911	22,2	1,0929
70	53,8	1,2546	53,9	1,2552	54,6	1,2593	-	-	-	-	-	-
80	-	-	54,6	1,2593	54,8	1,2605	-	-	-	-	-	-
90	-	-	54,8	1,2605	54,7	1,2599	-	-	-	-	-	-
100	-	-	-	-	54,7	1,2599	-	-	-	-	-	-

Tabla 7.3. Índices de refracción de los efluentes durante las perfusiones.

7.3.3 Peso y medida de los cerebros

Los cerebros extraídos se pesaron y midieron para evaluar efectos groseros de las soluciones utilizadas para las perfusiones en cada caso. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 7.4. Se observó que el cerebro de la rata S2 estaba más encogido que el resto, pero al realizar el análisis estadístico no se vieron diferencias significativas entre los grupos ni en cuanto al peso ni en cuanto a las dimensiones (fronto-caudal y lateral).

Rata	C1	C2	S1	S2	S3	E1	E2	E3
Peso (g)	1,660	1,807	1,534	1,100	1,315	1,407	1,370	1,857
Largo (mm)	23,23	22,67	22,5	20,30	20,87	21,33	21,96	26,96
Ancho (mm)	13,80	15,58	15,01	10,51	15,24	15,16	13,60	16,31

Tabla 7.4. Peso y medidas de los cerebros de cada grupo.

7.3.4 Inmunohistoquímica

Espesor de la corteza y del hipocampo

El espesor de la corteza y del hipocampo no varió significativamente entre los grupos experimentales ($p=0,299$ para espesor de corteza; $p=0,645$ para espesor de hipocampo) (**Fig. 7.1**). Dichos espesores se midieron en las imágenes de la inmunohistoquímica de NeuN (**Fig. 7.2**).

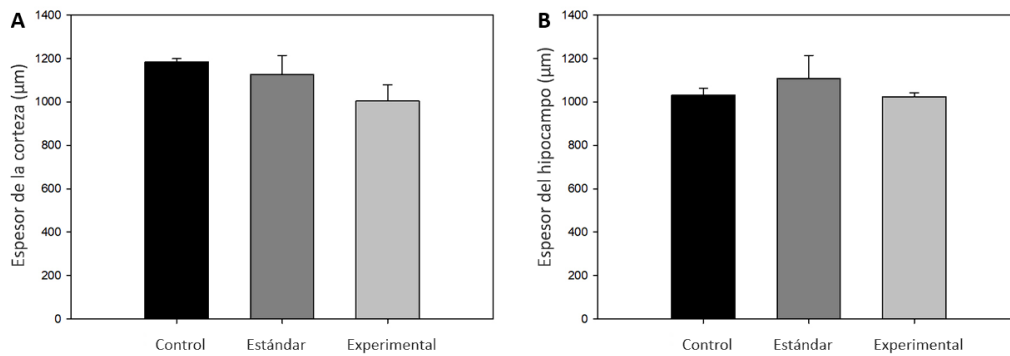


Figura 7.1. Medidas de espesor de la corteza y del hipocampo de los cerebros de cada grupo. **A)** Espesor de la corteza medido en µm. **B)** Espesor del hipocampo medido en µm.

Análisis de neuronas maduras

La inmunotinción se vio un poco más débil en los grupos criopreservados en comparación con el control, que fue perfundido normalmente. No se observaron diferencias en el número de neuronas maduras que se obtuvo para los tres grupos ($p=0,667$) (**Fig. 7.2 D**), mientras que el diámetro neuronal reveló una reducción significativa en el grupo estándar y experimental respecto al grupo control ($p=0,048$) (**Fig. 7.2 D, recuadro**).

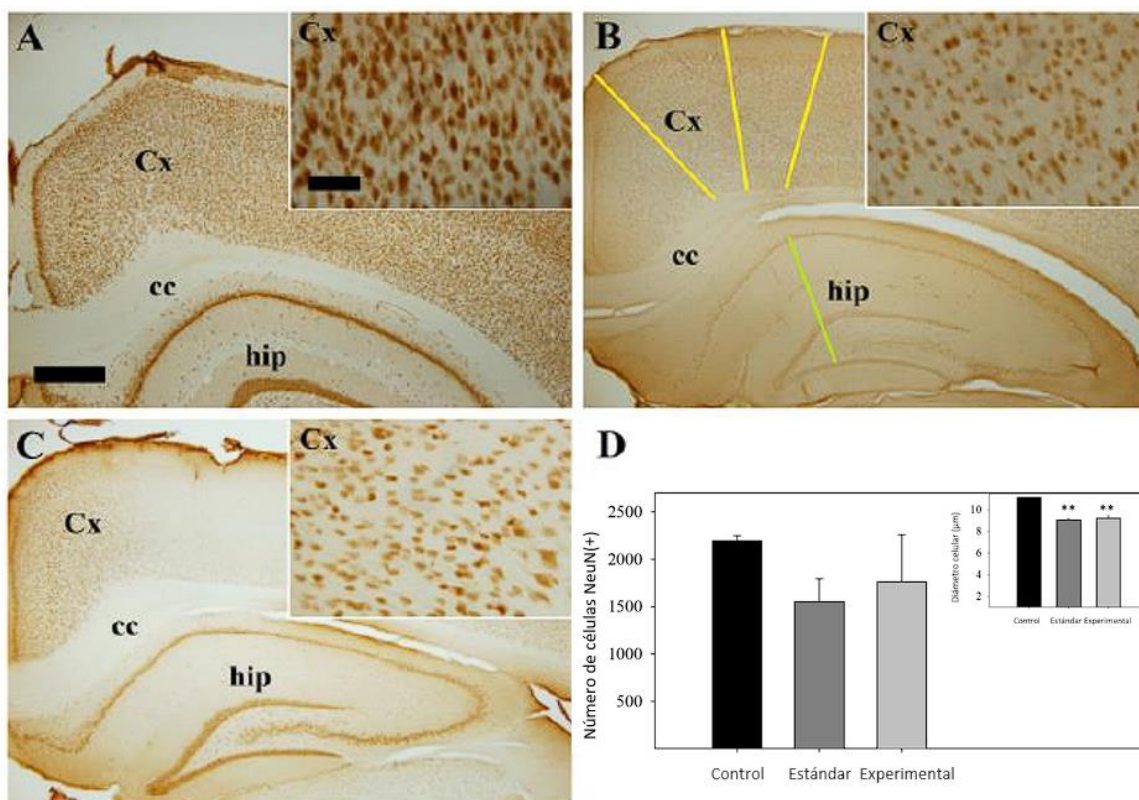


Figura 7.2. Neuronas maduras en la corteza. **(A – C)** Secciones coronales en representación de cada grupo de animales. Las células teñidas de color marrón son las células NeuN(+). Las líneas verdes y amarillas muestran los puntos de referencia donde se midieron los espesores cortical e hipocampal, respectivamente. **A)** Grupo control. **B)** Grupo estándar. **C)** Grupo experimental. Escala: 200 µm en las imágenes panorámicas, 50 µm en los recuadros. Los datos están expresados como promedio ± SEM. Abreviaciones: Cx (corteza); cc (cuerpo calloso); hip (hipocampo). **D)** Número de células NeuN(+) en el hipocampo de los tres grupos. Recuadro: diámetro de las células NeuN(+) expresado en µm.

Análisis de neuroblastos

La marcación de neuronas DCX(+) en el DG del hipocampo cayó marcadamente luego de la congelación de los cerebros. No sólo se encontraron diferencias significativas para los grupos estándar y experimental versus el grupo control ($p < 0,001$), sino que también se vio una disminución marcada en el grupo experimental respecto al grupo estándar ($p < 0,001$) (**Fig. 7.3 D**). Además se encontró una reducción en el diámetro de las células DCX(+) en los grupos criopreservados respecto al grupo control ($p=0,002$) (**Fig. 7.3 D, recuadro**).

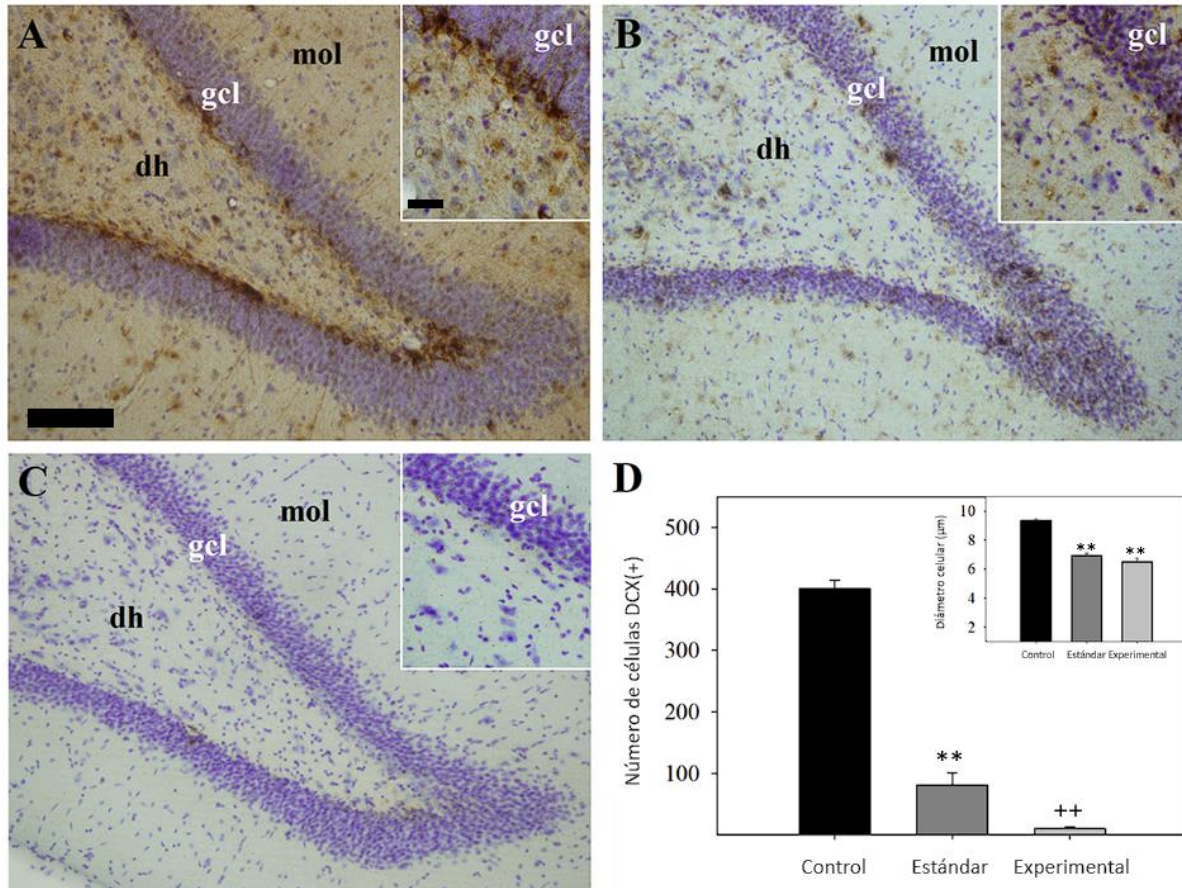


Figura 7.3. Neuronas inmaduras en el DG del hipocampo. **(A – C)** Secciones coronales en representación de cada grupo de animales. Las células teñidas de color marrón son las células DCX(+). La tinción violeta corresponde al Nissl. **A)** Grupo control. **B)** Grupo estándar. **C)** Grupo experimental. Escala: 100 µm en las imágenes panorámicas, 25 µm en los recuadros. Los datos están expresados como promedio \pm SEM. Abreviaciones: dh (*dentate hilus*); mol (*molecular layer*); gcl (*granular cell layer*). Los asteriscos representan la diferencia significativa en comparación al grupo control, mientras que las cruces representan la diferencia significativa entre el grupo experimental y estándar. **D)** Número de células DCX(+) en el hipocampo de los tres grupos. Recuadro: diámetro de las células DCX(+) expresado en µm.

Análisis de botones sinápticos

La inmunomarcación con sinaptofisina en el hipocampo de las ratas reveló una densidad bien conservada de conexiones presinápticas, un hallazgo consistente con la integridad de la red sináptica del hipocampo. De este modo, no se observaron diferencias significativas entre los tres grupos experimentales en cuanto al área inmunorreactiva de este marcador ($p=0,212$) (**Fig. 7.4**).

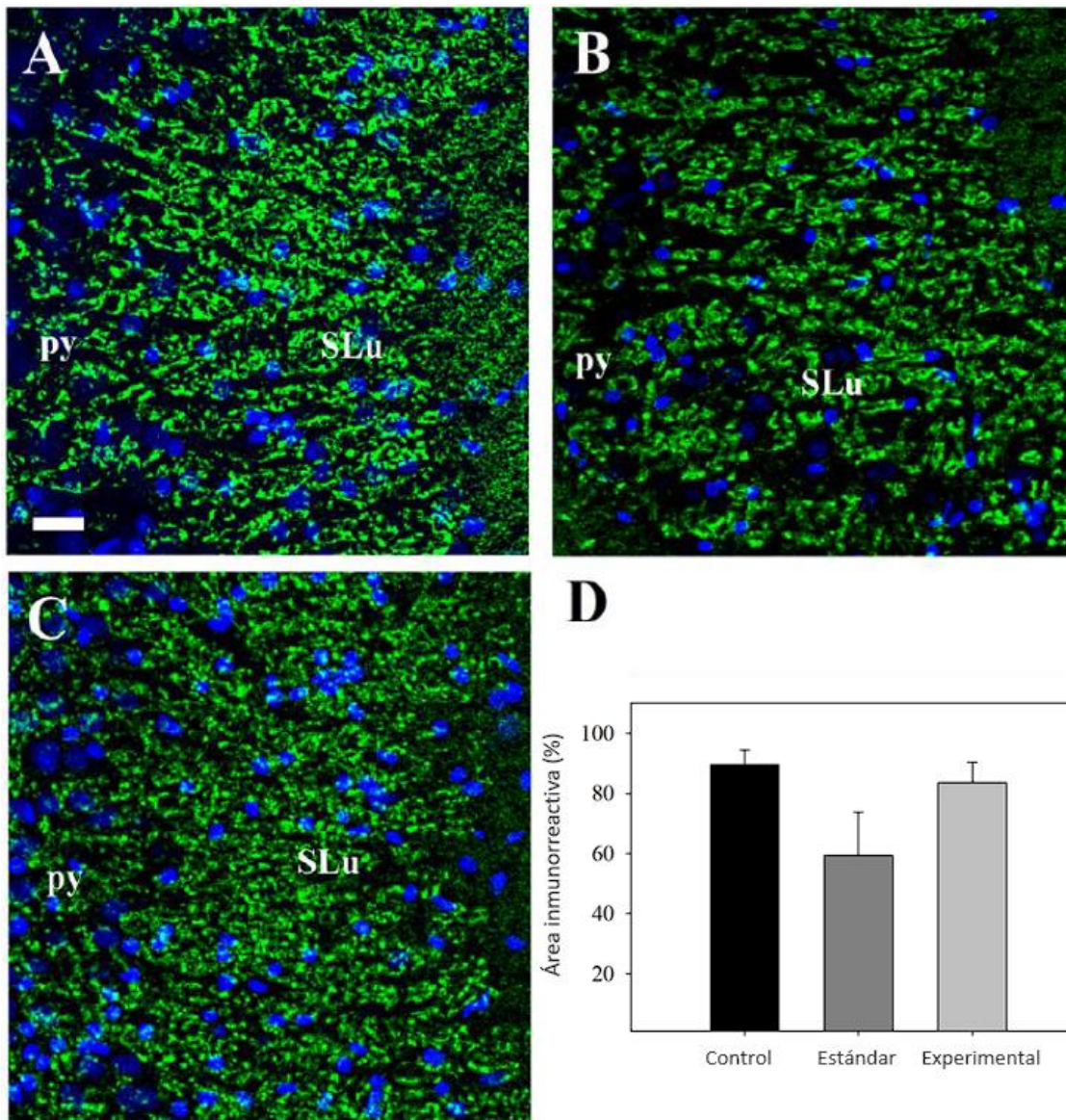


Figura 7.4. Botones sinápticos en la zona CA3 del hipocampo. **(A – C)** Secciones coronales en representación de cada grupo de animales. La fluorescencia verde corresponde a la marcación de sinaptofisina, la fluorescencia azul corresponde al DAPI. **A)** Grupo control. **B)** Grupo estándar. **C)** Grupo experimental. Escala: 20 μ m. Los datos están expresados como promedio \pm SEM. Abreviaciones: Py (*pyramidal layer*); Slu (*Stratum lucidum*). **D)** Área inmunorreactiva de sinaptofisina en la zona CA3 del hipocampo de los tres grupos.

7.4 Discusión

Los procedimientos detallados en este capítulo se implementaron con la idea de lograr la criopreservación del tejido durante un almacenamiento a muy bajas temperaturas. Esto permitiría no sólo almacenar los cerebros de interés por un tiempo más prolongado del habitual, sino también transportar dichos cerebros totalmente protegidos de una degradación en sus estructuras. No se han encontrado evidencias de formación de hielo en los cerebros de las ratas estándar ni experimentales, lo cual se traduce en que las soluciones empleadas en la perfusión efectivamente lograron proteger al tejido de la formación de cristales. Nuestros resultados revelaron también que, cuantitativamente, ninguno de los dos procedimientos crioprotectores tuvo un impacto adverso en el espesor del hipocampo o de la corteza. Sin

embargo, ambos procedimientos de congelación redujeron la inmunotinción de las diferentes poblaciones neuronales evaluadas, aunque en distinta medida. Así, mientras que las neuronas maduras (NeuNir) se vieron ligeramente afectadas, las neuronas inmaduras (DCXir) mostraron un impacto muy desfavorable. La DCX es expresada por las neuronas granulares inmaduras del giro dentado del hipocampo. Estas células, como se ha mencionado anteriormente, son células altamente excitables que se creen fundamentales para el aprendizaje continuo y la formación de la memoria (**Karl et al., 2005**). La disminución tan marcada de este marcador en los cerebros de las ratas experimentales sugiere que las neuronas DCX del hipocampo pueden haber sufrido daños irreversibles, lo cual es un aspecto a mejorar de estos procedimientos, abarcando tanto el proceso de vitrificación como el proceso de recalentamiento, dado que las neuronas DCX son altamente vulnerables al envejecimiento (**Morel et al., 2015**), y por tanto en los cerebros de ratas a las que se les aplicó una terapia génica probablemente estén disminuidas desde un principio. Por este motivo es necesario preservar al máximo esta población neuronal tal como se encuentra en el momento del sacrificio para los estudios posteriores. El hallazgo más alentador de los descritos en este capítulo es que la densidad de las sinapsis del hipocampo (área inmunorreactiva correspondiente a sinaptofisina) no se vio afectada por ninguno de los protocolos crioprotectores, de modo que podríamos inferir que los cerebros criopreservados conservan una parte sustancial de la información presente en el sistema nervioso en el momento de la muerte.

7.5 Conclusiones

- Los protocolos de crioprotección evaluados en el presente capítulo son efectivos en cuanto a proteger al tejido de la formación de hielo.
- No se observaron efectos adversos de los protocolos de criopreservación en el espesor cortical ni en el espesor del hipocampo de los cerebros.
- Las conexiones sinápticas se preservaron correctamente luego de la criopreservación.
- La población de neuronas maduras no se vio afectada en cuanto a número, pero se observó un cambio en el diámetro de las células NeuN(+).
- Se necesita mejorar la técnica para evitar el daño de la población celular de neuronas inmaduras del giro dentado, cruciales en nuestros estudios por ser críticas para el aprendizaje en los animales y por verse particularmente afectadas por el envejecimiento.

Capítulo VIII: Conclusiones generales

A lo largo de este trabajo de tesis doctoral se logró construir, caracterizar y utilizar un vector adenoviral para realizar reprogramación parcial en fibroblastos envejecidos, así como terapia génica en el cerebro de ratas envejecidas. Este adenovector fue construido en nuestro laboratorio (**Lehmann et al., 2019**) y es el primer vector viral reportado que porta los cuatro genes OSKM bajo el control de un promotor bidireccional regulable que controla también la expresión del gen reportero GFP. Se ha demostrado mediante el agregado de DOX que este sistema regulable funciona correctamente *in vitro*. Se determinó que el virus expresa los 5 genes de interés *in vitro*, así como GFP y OCT4 *in vivo*. Más aún, el monitoreo de la expresión de GFP en el hipocampo demostró que una expresión continua de al menos 49 días no genera efectos adversos aparentes como muerte celular y teratomas, lo cual nos permitiría implementar una terapia segura. Esto concuerda con trabajos previos que reportan terapias realizadas con vectores virales, en los cuales la sobreexposición a los genes exógenos durante largos períodos de tiempo genera efectos regenerativos sin efectos secundarios aparentes (**Lu et al., 2020**). En animales transgénicos, en cambio, la expresión continua de estos mismos genes en todas sus células conduce a la formación de teratomas y a la muerte del animal (**Ocampo et al., 2016**). De esta manera, se busca que las terapias con estos genes eviten la desdiferenciación total de las células, ya sea mediante el uso de vectores virales o de esquemas de inducción cíclicos (**Lu et al., 2020; Ocampo et al., 2016; Wi et al., 2016**). Otro factor a tener en cuenta es que, si bien nuestro vector ha mostrado una buena capacidad de transducción, la inclusión del gen reportero en otro extremo del promotor en el genoma del virus reduce los niveles de expresión de los genes OSKM (**Chen et al., 2021**), disminuyendo así su capacidad de reprogramación, lo cual favorece la posibilidad de implementar nuestro virus como una terapia de exposición continua sin generar una reprogramación celular total. La caracterización del virus presentada en esta tesis junto con estudios adicionales que se han realizado en nuestro grupo de laboratorio nos permiten proponer al virus HD-OSKM como una herramienta adecuada para implementar reprogramación parcial, regeneración y rejuvenecimiento tanto *in vitro* como *in vivo*.

Previo a utilizar el adenovector para implementar terapia regenerativa *in vivo*, se realizó una caracterización de nuestro modelo de envejecimiento espontáneo, la rata hembra SD. Dicho modelo presenta un deterioro de la memoria espacial con el envejecimiento, acompañado de una drástica caída de la neurogénesis. Esto ha sido reportado en un trabajo previo de nuestro grupo (**Morel et al., 2015**). La caracterización llevada a cabo en este trabajo de tesis puso foco a la memoria de reconocimiento en la mediana edad y el envejecimiento. Hemos demostrado que también la memoria de reconocimiento de las ratas se ve afectada por el envejecimiento, siendo más vulnerable cuando se evalúa el componente espacial, que presenta un déficit temprano a partir de la mediana edad. Estos cambios mnemónicos están acompañados por una caída en la neurogénesis en el hipocampo, entre otros cambios que afectan a las variadas poblaciones celulares de las regiones de interés (**Canatelli Mallat et al., 2022**). Las regiones del cerebro involucradas en la memoria espacial y de reconocimiento son principalmente el hipocampo y la corteza perirrinal. Este trabajo es el primero en evidenciar una reducción de

las células microgliales en la corteza perirrinal en las ratas de mediana edad y seniles, sugiriendo una alteración en la comunicación neurona – microglía temprana, en línea con otros estudios que han descrito una disminución del número de microglía en la sustancia nigra, el estriado y la corteza cerebral de ratones macho C57BL/6J de 18 y 24 meses de edad (**Sharaf et al., 2013**). A su vez, como se ha mencionado previamente, encontramos que el hipocampo (de vital importancia para la memoria espacial y la memoria de reconocimiento de objetos relacionada a la localización de los mismos) se ve afectado más temprano en el envejecimiento que la corteza perirrinal. Esto reforzó la idea de que esta región es el objetivo idóneo para la terapia regenerativa con los genes OSKM.

Una vez finalizada la caracterización mnemónica del modelo de envejecimiento, se logró poner a punto un reloj epigenético adecuado para aplicar en tejidos de rata. Hasta el momento, no existía un reloj apto para predecir la edad epigenética de esta especie. Este biomarcador de edad de alta precisión nos permitió enriquecer el estudio de los efectos de la terapia con nuestro HD-OSKM, así como también nos permitirá evaluar los resultados de terapias futuras, ya sea que las mismas se apliquen *in vitro* o *in vivo*. De hecho, se aplicó en otros estudios del grupo para correlacionar la edad epigenética del hipocampo con el deterioro cognitivo de las ratas. Si bien no se han podido correlacionar las edades epigenéticas de los animales con los parámetros de las pruebas comportamentales, se ha encontrado, al evaluar el metiloma del hipocampo de dichos animales, una correlación negativa entre los parámetros cognitivos y 14 CpGs relacionadas a factores de transcripción implicados en el desarrollo del sistema nervioso (**Chiavellini et al., 2022**). De este modo, las alteraciones en la metilación podrían estar teniendo un impacto en la memoria de los animales mediante la alteración de la plasticidad neuronal del hipocampo (**Bellchambers y Ware, 2018**).

Finalmente se evaluó el efecto de la terapia con el vector HD-OSKM en el hipocampo de ratas seniles. La sobreexpresión de los genes en el hipocampo de las ratas durante 49 días no generó teratomas ni otros efectos adversos. Esto puede relacionarse con el hecho de que la capacidad de reprogramación de nuestro virus se encuentra disminuida dado que la expresión de los genes OSKM es menor a causa de que dicho virus también expresa un gen reportero. Esto también se condice con los resultados hallados en la tesis de la Dra. Priscila Chiavellini, en la cual se intentó generar células madre pluripotentes inducidas, obteniendo resultados negativos. De este modo, podemos afirmar que las células del cerebro no están sufriendo una reprogramación total.

El desempeño cognitivo de los animales en cuanto a su memoria de reconocimiento de objetos no mostró mejoras con 30 días de sobreexpresión de los genes OSKM en el giro dentado de las ratas seniles. Sin embargo, la sobreexpresión de dichos genes durante 38 días dio como resultado una mejora en el aprendizaje de las ratas seniles, no así en su memoria a largo plazo. Creemos que estos resultados están relacionados al tiempo de exposición a los genes, ya que en otros trabajos en los que se hallaron efectos regenerativos, la terapia fue más prolongada (**Lu et al., 2020**). De este modo, en 38 días, el virus tiene un efecto en la memoria a corto plazo de los animales, que no es suficiente para llegar a mejorar también su memoria a largo plazo. Aun así, estos resultados refuerzan los hallazgos de trabajos previos

en cuanto al beneficio de implementar terapia génica con los genes OSKM con el fin de generar un rejuvenecimiento a nivel del sistema nervioso central.

Por otro lado, al evaluar la población de neuroblastos en el hipocampo de las ratas tratadas, no se hallaron diferencias significativas respecto a las ratas que recibieron el vector control, de modo que no podemos correlacionar la mejora observada en el aprendizaje con un aumento de la neurogénesis en estas ratas. Otros grupos han reportado mejoras en la función biológica sin aumento en la proliferación (**Lu et al., 2020; Rodríguez-Matellán et al., 2020**). También evaluamos el efecto de los OSKM sobre la sinapsis en el hipocampo a través del marcador presináptico sinaptofisina. Encontramos que la marcación de botones presinápticos en las ratas envejecidas, ya sea tratadas o control, era mayor que en las ratas jóvenes, resultados que se condicen con estudios previos (**Eastwood et al., 2006**), pero no observamos diferencias entre estos dos grupos de animales. Por otro lado, al analizar la edad epigenética de los hipocampos de los diferentes grupos de ratas, sólo encontramos diferencias significativas entre el grupo joven y los grupos envejecidos, pero no entre los hipocampos provenientes de ratas envejecidas tratadas y control. Sin embargo, se observa una leve disminución de la edad epigenética de los hipocampos tratados. Estos resultados en conjunto nos llevaron a pensar que los cambios que están ocurriendo se están dando a nivel del entorno celular, quizás en poblaciones no neuronales como la microglía, que ha sido señalada en varios estudios como una población de suma importancia para la memoria y el aprendizaje (**Kreutzberg, 1996; Tremblay et al., 2010; Frost y Schafer, 2016; Wolf et al., 2017; Bachiller et al., 2018**). Esto puede relacionarse a que hay relativamente pocas células que han sido transducidas y directamente rejuvenecidas por la terapia.

Los estudios realizados en el cerebro de la rata senil a través de la aplicación del vector HD-OSKM presentados en esta tesis son pioneros en el área de rejuvenecimiento por reprogramación celular. En experimentos futuros se evaluarán los efectos de una terapia más prolongada (>60 días de tratamiento) y/o con un inicio más temprano, además de la evaluación de marcadores de otras poblaciones neuronales y no neuronales del hipocampo.

A fin de optimizar nuestros estudios histológicos de los cerebros tratados con el adenovector HD-OSKM y aumentar la reproducibilidad de los mismos, buscamos que los cerebros se conserven libres de todo tipo de daño del tejido. En este trabajo se logró poner a punto una técnica de criopreservación que permite conservar los tejidos y las conexiones de los cerebros intactos. Sin embargo, las neuronas inmaduras del hipocampo se vieron muy afectadas. Debido a la gran importancia de esta población celular, por ser crítica para los procesos de memoria y aprendizaje y por verse severamente afectada por el envejecimiento (**Karl et al., 2005; Morel et al., 2015**), es necesario mejorar la técnica de criopreservación y el proceso de recalentamiento de los cerebros para maximizar la preservación de dichas células. Queda pendiente, a futuro, optimizar este proceso.

Bibliografía

- Abe, H., Ishida, Y., Nonaka, H., Iwasaki, T. (2009). Functional difference between rat perirhinal cortex and hippocampus in object and place discrimination tasks. *Behav Brain Res*, 197(2), 388-97. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.10.012>
- Adams, B., Sazgar, M., Osehobo, P., Van der Zee, C. E., Diamond, J., Fahnstock, M., & Racine, R. J. (1997). Nerve growth factor accelerates seizure development, enhances mossy fiber sprouting, and attenuates seizure-induced decreases in neuronal density in the kindling model of epilepsy. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 17(14), 5288–5296. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-14-05288.1997>
- Aggleton, J.P., O'Mara, S.M., Vann, S.D., Wright, N.F., Tsanov, M., Erichsen, J.T. (2010). Hippocampal-anterior thalamic pathways for memory: uncovering a network of direct and indirect actions. *Eur J Neurosci*, 31(12), 2292-307. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07251.x>
- Aimone, J.B., Deng, W., Gage, F.H. (2010). Adult neurogenesis: integrating theories and separating functions. *Trends Cogn Sci*, 14(7), 325-37. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2010.04.003>
- Alba, R., Bosch, A., & Chillon, M. (2005). Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. *Gene therapy*, 12 Suppl 1, S18–S27. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302612>
- Albasser, M.M., Davies, M., Futter, J.E., Aggleton, J.P. (2009). Magnitude of the object recognition deficit associated with perirhinal cortex damage in rats: Effects of varying the lesion extent and the duration of the sample period. *Behav Neurosci*, 123(1), 115-24. <https://doi.org/10.1037/a0013829>
- Alberini, C.M., Cruz, E., Descalzi, G., Bessières, B., Gao, V. (2018). Astrocyte glycogen and lactate: New insights into learning and memory mechanisms. *Glia*, 66(6), 1244-1262. <https://doi.org/10.1002/glia.23250>
- Ames, B.N. (1989). Endogenous oxidative DNA damage, aging, and cancer. *Free Radic Res Commun*, 7(3-6), 121-8. <https://doi.org/10.3109/10715768909087933>
- Anglada, T., Genescà, A., Martín, M. (2020). Age-associated deficient recruitment of 53BP1 in G1 cells directs DNA double-strand break repair to BRCA1/CtIP-mediated DNA-end resection. *Aging*, 12(24), 24872-24893. <https://doi.org/10.18632/aging.202419>
- Arneson, A., Haghani, A., Thompson, M.J., Pellegrini, M., Kwon, S.B., Vu, H., Maciejewski, E., Yao, M., Li, C.Z., Lu, A.T., Morselli, M., Rubbi, L., Barnes, B., Hansen, K.D., Zhou, W., Breeze, C.E., Ernst, J., Horvath, S. (2022). A mammalian methylation array for profiling methylation levels at conserved sequences. *Nat Commun* 13(1), 783. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28355-z>

- Aunan, J.R., Watson, M.M., Hagland, H.R., Søreide, K. (2016). Molecular and biological hallmarks of ageing. *Br J Surg*, 103(2), 29-46. <https://doi.org/10.1002/bjs.10053>
- Bachiller, S., Jiménez-Ferrer, I., Paulus, A., Yang, Y., Swanberg, M., Deierborg, T., Boza-Serrano, A. (2018). Microglia in Neurological Diseases: A Road Map to Brain-Disease Dependent-Inflammatory Response. *Front Cell Neurosci*, 12(488). <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00488>
- Baker, K.B., Kim, J.J. (2002). Effects of stress and hippocampal NMDA receptor antagonism on recognition memory in rats. *Learn Mem*, 9(2), 58-65. <https://doi.org/10.1101/lm.46102>
- Barnes, C.A., McNaughton, B.L. (1980). Physiological compensation for loss of afferent synapses in rat hippocampal granule cells during senescence. *J Physiol*, 309, 473-85. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1980.sp013521>
- Bar-Nur, O., Verheul, C., Sommer, A.G., Brumbaugh, J., Schwarz, B.A., Lipchina, I., Huebner, A.J., Mostoslavsky, G., Hochedlinger, K. (2015). Lineage conversion induced by pluripotency factors involves transient passage through an iPSC stage. *Nat Biotechnol*, 33(7), 761-8. <https://doi.org/10.1038/nbt.3247>
- Bartko, S.J., Winters, B.D., Cowell, R.A., Saksida, L.M., Bussey, T.J. (2007). Perirhinal cortex resolves feature ambiguity in configural object recognition and perceptual oddity tasks. *Learn Mem*, 14(12), 821-32. <https://doi.org/10.1101/lm.749207>
- Bartolini, L., Casamenti, F., Pepeu, G. (1996). Aniracetam restores object recognition impaired by age, scopolamine, and nucleus basalis lesions. *Pharmacol Biochem Behav*, 53(2), 277-83. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(95\)02021-7](https://doi.org/10.1016/0091-3057(95)02021-7)
- Basarkar, A., Singh, J. (2007). Nanoparticulate systems for polynucleotide delivery. *Int J Nanomedicine*, 2(3), 353-60.
- Bekinschtein, P., Kent, B.A., Oomen, C.A., Clemenson, G.D., Gage, F.H., Saksida, L.M., Bussey, T.J. (2013). BDNF in the dentate gyrus is required for consolidation of "pattern-separated" memories. *Cell Rep*, 5(3), 759-68. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.09.027>
- Bellchambers, H. M., & Ware, S. M. (2018). ZIC3 in heterotaxy. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1046, 301–327. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7311-3_15/COVER
- Benihoud, K., Yeh, P., Perricaudet, M. (1999). Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr. Opin. Biotechnol*, 10, 440–447.
- Bergelson, J. M., J. A. Cunningham, G. Droguett, E. A. Kurt-Jones, A. Krithivas, J. S. Hong, M. S. Horwitz, R. L. Crowell, y R. W. Finberg. (1997). Isolation of a Common Receptor for Cocksackie B Viruses and Adenoviruses 2 and 5. *Science (New York, N.Y.)*, 275 (5304), 1320-23.

- Bett, A.J., Haddara, W., Prevec, L., & Graham, F. L. (1994). An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(19), 8802–8806. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.19.8802>
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*, *16*(1), 6-21. <https://doi.org/10.1101/gad.947102>
- Bjornsson, H.T., Sigurdsson, M.I., Fallin, M.D., Irizarry, R.A., Aspelund, T., Cui, H., Yu, W., Rongione, M.A., Ekström, T.J., Harris, T.B., Launer, L.J., Eiriksdottir, G., Leppert, M.F., Sapienza, C., Gudnason, V., Feinberg, A.P. (2008). Intra-individual change over time in DNA methylation with familial clustering. *JAMA*, *299*(24), 2877-83. <https://doi.org/10.1001/jama.299.24.2877>
- Bollati, V., Schwartz, J., Wright, R., Litonjua, A., Tarantini, L., Suh, H., Sparrow, D., Vokonas, P., Baccarelli, A. (2009). Decline in genomic DNA methylation through aging in a cohort of elderly subjects. *Mech Ageing Dev*, *130*(4), 234-9. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2008.12.003>
- Bormann, F., Rodríguez-Paredes, M., Hagemann, S., Manchanda, H., Kristof, B., Gutekunst, J., Raddatz, G., Haas, R., Terstegen, L., Wenck, H., Kaderali, L., Winnefeld, M., Lyko, F. (2016). Reduced DNA methylation patterning and transcriptional connectivity define human skin aging. *Aging Cell*, *15*(3), 563-71. <https://doi.org/10.1111/accel.12470>
- Bourne, J., & Harris, K. M. (2007). Do thin spines learn to be mushroom spines that remember?. *Current opinion in neurobiology*, *17*(3), 381–386. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2007.04.009>
- Broccoli, D., Young, J. W., & de Lange, T. (1995). Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(20), 9082–9086. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.20.9082>
- Brons, J.F., and Woody, C.D. (1980). Long-term changes in excitability of cortical neurons after Pavlovian conditioning and extinction. *J. Neurophysiol*, *44*, 605–615.
- Browder, K. C., Reddy, P., Yamamoto, M., Haghani, A., Guillen, I. G., Sahu, S., Wang, C., Luque, Y., Prieto, J., Shi, L., Shojima, K., Hishida, T., Lai, Z., Li, Q., Choudhury, F. K., Wong, W. R., Liang, Y., Sangaraju, D., Sandoval, W., Esteban, C. R., ... Izpisua Belmonte, J. C. (2022). In vivo partial reprogramming alters age-associated molecular changes during physiological aging in mice. *Nature aging*, *2*(3), 243–253. <https://doi.org/10.1038/s43587-022-00183-2>
- Brown, K., Robertson, K. (2007). DNMT1 knockout delivers a strong blow to genome stability and cell viability. *Nat Genet* *39*, 289–290. <https://doi.org/10.1038/ng0307-289>
- Burke, S. N., & Barnes, C. A. (2006). Neural plasticity in the ageing brain. *Nature reviews. Neuroscience*, *7*(1), 30–40. <https://doi.org/10.1038/nrn1809>

- Burke, S.N., Wallace, J.L., Nematollahi, S., Uprety, A.R., Barnes, C.A. (2010). Pattern separation deficits may contribute to age-associated recognition impairments. *Behav Neurosci*, *124*(5), 559-73. <https://doi.org/10.1037/a0020893>
- Bussey, T.J., Saksida, L.M., Murray, E.A. (2002). Perirhinal cortex resolves feature ambiguity in complex visual discriminations. *Eur J Neurosci*, *15*(2), 365-74. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01851.x>
- C`es, A., Burg, T., Herbeaux, K., H´eraud, C., Bott, J.B., Mensah-Nyagan, A.G., Mathis, C. (2018). Age-related vulnerability of pattern separation in C57BL/6J mice. *Neurobiol Aging*, *62*, 120–129.
- Cai, D.J., Aharoni, D., Shuman, T., Shobe, J., Biane, J., Song, W., Wei, B., Veshkini, M., La-Vu, M., Lou, J., Flores, S.E., Kim, I., Sano, Y., Zhou, M., Baumgaertel, K., Lavi, A., Kamata, M., Tuszyński, M., Mayford, M., Golshani, P., Silva, A.J. (2016). A shared neural ensemble links distinct contextual memories encoded close in time. *Nature*, *534*(7605), 115-8. <https://doi.org/10.1038/nature17955>
- Calhoun, M.E., Jucker, M., Martin, L.J., Thinakaran, G., Price, D.L., Mouton, P.R. (1996). Comparative evaluation of synaptophysin-based methods for quantification of synapses. *J Neurocytol*, *25*(12), 821-8. <https://doi.org/10.1007/BF02284844>
- Calhoun, M.E., Kurth, D., Phinney, A.L., Long, J.M., Hengemihle, J., Mouton, P.R., Ingram, D.K., Jucker, M. (1998). Hippocampal neuron and synaptophysin-positive bouton number in aging C57BL/6 mice. *Neurobiol Aging*, *19*(6), 599-606. [https://doi.org/10.1016/s0197-4580\(98\)00098-0](https://doi.org/10.1016/s0197-4580(98)00098-0)
- Campbell, B. K., Hernandez-Medrano, J., Onions, V., Pincott-Allen, C., Aljaser, F., Fisher, J., McNeilly, A. S., Webb, R., & Picton, H. M. (2014). Restoration of ovarian function and natural fertility following the cryopreservation and autotransplantation of whole adult sheep ovaries. *Human reproduction (Oxford, England)*, *29*(8), 1749–1763. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu144>
- Campisi, J. (1997). The biology of replicative senescence. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, *33*(5), 703–709. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(96\)00058-5](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(96)00058-5)
- Campisi, J., Vijg, J. (2009). Does damage to DNA and other macromolecules play a role in aging? If so, how? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, *64*(2), 175-8. <https://doi.org/10.1093/gerona/gln065>
- Campos, S.K., Barry, M.A. (2007). Current Advances and Future Challenges in Adenoviral Vector Biology and Targeting. *Current Gene Therapy*, *7*(3), 189-204.
- Canatelli Mallat, M., Chiavellini, P., Lehmann, M., Goya, R. G., & Morel, G. R. (2022). Age-related loss of recognition memory and its correlation with hippocampal and perirhinal cortex changes in female Sprague Dawley rats. *Behavioural brain research*, *435*, 114026. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2022.114026>

- Causing, C. G., Gloster, A., Aloyz, R., Bamji, S. X., Chang, E., Fawcett, J., Kuchel, G., & Miller, F. D. (1997). Synaptic innervation density is regulated by neuron-derived BDNF. *Neuron*, *18*(2), 257–267. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80266-4](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80266-4)
- Chawla, M.K., Penner, M.R., Olson, K.M., Sutherland, V.L., Mittelman-Smith, M.A., Barnes, C.A. (2013). Spatial behavior and seizure-induced changes in c-fos mRNA expression in young and old rats. *Neurobiol Aging*, *34*(4), 1184-98. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.10.017>
- Chen, K.S., Masliah, E., Mallory, M., Gage, F.H. (1995). Synaptic loss in cognitively impaired aged rats is ameliorated by chronic human nerve growth factor infusion. *Neuroscience*, *68*(1), 19-27. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00099-5](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00099-5)
- Chen, R. F., & Lee, C. Y. (2014). Adenoviruses types, cell receptors and local innate cytokines in adenovirus infection. *International reviews of immunology*, *33*(1), 45–53. <https://doi.org/10.3109/08830185.2013.823420>
- Chen, Y., Lüttmann, F. F., Schoger, E., Schöler, H. R., Zelarayán, L. C., Kim, K. P., Haigh, J. J., Kim, J., & Braun, T. (2021). Reversible reprogramming of cardiomyocytes to a fetal state drives heart regeneration in mice. *Science (New York, N.Y.)*, *373*(6562), 1537–1540. <https://doi.org/10.1126/science.abg5159>
- Chiavellini, P., Lehmann, M., Canatelli Mallat, M., Zoller, J.A., Herenu, C.B., Morel, G.R., Horvath, S., Goya, R.G. (2022). Hippocampal DNA Methylation, Epigenetic Age, and Spatial Memory Performance in Young and Old Rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, *77*(12), 2387-2394. <https://doi.org/10.1093/gerona/glac153>
- Chiu, C.P., Dragowska, W., Kim, N.W., Vaziri, H., Yui, J., Thomas, T.E., Harley, C.B., Lansdorp, P.M. (1995). Telomerase expression in human cells and tissues. *Aging Clin. Exp. Res.* *7*, 460.
- 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*, *360*(6387), 430-435. <https://doi.org/10.1126/science.aas9204>
- Christensen, B.C., Houseman, E.A., Marsit, C.J., Zheng, S., Wrensch, M.R., Wiemels, J.L., Nelson, H.H., Karagas, M.R., Padbury, J.F., Bueno, R., Sugarbaker, D.J., Yeh, R.F., Wiencke, J.K., Kelsey, K.T. (2009). Aging and environmental exposures alter tissue-specific DNA methylation dependent upon CpG island context. *PLoS Genet*, *5*(8), e1000602. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000602>
- Clark, R.E., Zola, S.M., Squire, L.R. (2000). Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. *J Neurosci*, *20*(23), 8853-60. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-23-08853.2000>
- Clarke, J.R., Cammarota, M., Gruart, A., Izquierdo, I., Delgado-García, J.M. (2010). Plastic modifications induced by object recognition memory processing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(6), 2652-7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0915059107>

- Clelland, C.D., Choi, M., Romberg, C., Clemenson, G.D. Jr, Fragniere, A., Tyers, P., Jessberger, S., Saksida, L.M., Barker, R.A., Gage, F.H., Bussey, T.J. (2009). A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science*, *325*(5937), 210-3. <https://doi.org/10.1126/science.1173215>
- Cole, J.J., Robertson, N.A., Rather, M.I., Thomson, J.P., McBryan, T., Sproul, D., Wang, T., Brock, C., Clark, W., Ideker, T., Meehan, R.R., Miller, R.A., Brown-Borg, H.M., Adams, P.D. (2017). Diverse interventions that extend mouse lifespan suppress shared age-associated epigenetic changes at critical gene regulatory regions. *Genome Biol*, *18*(1), 58. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1185-3>
- Coleman, P., Finch, C., Joseph, J. (2004). The need for multiple time points in aging studies. *Neurobiol. Aging*, *25*, 3–4. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(90\)90055-5](https://doi.org/10.1016/0197-4580(90)90055-5)
- Conde, J.R., Streit, W.J. (2006). Microglia in the aging brain. *J Neuropathol Exp Neurol*, *65*(3), 199-203. <https://doi.org/10.1097/01.jnen.0000202887.22082.63>
- Cortessis, V.K., Thomas, D.C., Levine, A.J., Breton, C.V., Mack, T.M., Siegmund, K.D., Haile, R.W., Laird, P.W. (2012). Environmental epigenetics: prospects for studying epigenetic mediation of exposure-response relationships. *Hum Genet*, *131*(10), 1565-89. <https://doi.org/10.1007/s00439-012-1189-8>
- Craik, F.I.M., Byrd, M. (1982). Aging and Cognitive Deficits. In: Craik, F.I.M., Trehub, S. (eds) *Aging and Cognitive Processes. Advances in the Study of Communication and Affect*, vol 8. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-4178-9_11
- Davies, H.A., Kelly, A., Dhanrajan, T.M., Lynch, M.A., Rodriguez, J.J., Steward, M.G. (2003). Synaptophysin immunogold labelling of synapses decreases in dentate gyrus of the hippocampus of aged rats. *Brain Res*, *986*, 191–195.
- Davis, R.L., Weintraub, H., Lassar, A.B. (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell*, *51*, 987-1000.
- Davison, A. J., Benkó' M., Harrach, B. (2003). Genetic content and evolution of adenoviruses. *Journal of General Virology*, *84*, 2895-2908. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19497-0>
- de Brabander, J.M., Kramers, R.J., Uylings, H.B. (1998). Layer-specific dendritic regression of pyramidal cells with ageing in the human prefrontal cortex. *Eur J Neurosci*, *10*(4), 1261-9. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1998.00137.x>
- De Laporte, L., Cruz Rea, J., & Shea, L. D. (2006). Design of modular non-viral gene therapy vectors. *Biomaterials*, *27*(7), 947–954. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.09.036>
- de Lima, M.N., Laranja, D.C., Bromberg, E., Roesler, R., Schröder, N. (2005). Pre- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats. *Behav Brain Res*, *156*(1), 139-43. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.05.016>

- Deng, W., Aimone, J.B., Gage, F.H. (2010). New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci*, 11(5), 339-50. <https://doi.org/10.1038/nrn2822>
- Deng, W., Mayford, M., Gage, F.H. (2013). Selection of distinct populations of dentate granule cells in response to inputs as a mechanism for pattern separation in mice. *Elife*, 2, e00312. <https://doi.org/10.7554/eLife.00312>
- Dickstein, D.L., Kabaso, D., Rocher, A.B., Luebke, J.I., Wearne, S.L., Hof, P.R. (2007). Changes in the structural complexity of the aged brain. *Aging Cell*, 6(3), 275-84. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00289.x>
- Dillon, S.E., Tsivos, D., Knight, M., McCann, B., Pennington, C., Shiel, A.I., Conway, M.E., Newson, M.A., Kauppinen, R.A., Coulthard, E.J. (2017). The impact of ageing reveals distinct roles for human dentate gyrus and CA3 in pattern separation and object recognition memory. *Sci Rep*, 7(1), 14069. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13853-8>
- Disterhoft, J.F., and Oh, M.M. (2006). Learning, aging and intrinsic neuronal plasticity. *Trends Neurosci*, 29, 587–599.
- Disterhoft, J.F., Coulter, D.A., and Alkon, D.L. (1986). Conditioning-specific membrane changes of rabbit hippocampal neurons measured *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 2733–2737.
- Diz-Chaves, Y., Astiz, M., Bellini, M.J., Garcia-Segura, L.M. (2013). Prenatal stress increases the expression of proinflammatory cytokines and exacerbates the inflammatory response to LPS in the hippocampal formation of adult male mice. *Brain Behav Immun*, 28, 196-206. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.11.013>
- Dorner, D., Vlcek, S., Foeger, N., Gajewski, A., Makolm, C., Gotzmann, J., Hutchison, C.J., Foisner, R. (2006). Lamina-associated polypeptide 2alpha regulates cell cycle progression and differentiation via the retinoblastoma-E2F pathway. *J Cell Biol*, 173(1), 83-93. <https://doi.org/10.1083/jcb.200511149>
- Dubé, I. D., & Cournoyer, D. (1995). Gene therapy: here to stay. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*, 152(10), 1605–1613.
- Dudai, Y., Eisenberg, M. (2004). Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. *Neuron*, 44(1), 93-100. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.09.003>
- Dudai, Y., Roediger, H. L. III, & Tulving, E. (2007). Memory concepts. In H. L. Roediger III, Y. Dudai, & S. M. Fitzpatrick (Eds.), *Science of memory: Concepts* (pp. 1–9). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780195310443.003.0001>
- Dumitriu, D., Hao, J., Hara, Y., Kaufmann, J., Janssen, W. G., Lou, W., Rapp, P. R., & Morrison, J. H. (2010). Selective changes in thin spine density and morphology in monkey

- prefrontal cortex correlate with aging-related cognitive impairment. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(22), 7507–7515. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6410-09.2010>
- Eastwood, S.L., Weickert, C.S., Webster, M.J., Herman, M.M., Kleinman, J.E., Harrison, P.J. (2006). Synaptophysin protein and mRNA expression in the human hippocampal formation from birth to old age. *Hippocampus*, 16(8), 645-54. <https://doi.org/10.1002/hipo.20194>
- Efe, J.A., Hilcove, S., Kim, J., Zhou, H., Ouyang, K., Wang, G., Chen, J., Ding, S. (2011). Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocytes using a direct reprogramming strategy. *Nat Cell Biol*, 13(3), 215-22. <https://doi.org/10.1038/ncb2164>
- Ekdahl, C.T., Kokaia, Z., Lindvall, O. (2009). Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia. *Neuroscience*, 158(3), 1021-9. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.06.052>
- Engelhardt, E., Levy, G. (2023). The memory engram: beginning the search. *Dement. Neuropsychol*, 17, e20220059, 1-5. <https://doi.org/10.1590/1980-5764-DN-2022-0059>
- Erwin, S.R., Sun, W., Copeland, M., Lindo, S., Spruston, N., Cembrowski, M.S. (2020). A Sparse, Spatially Biased Subtype of Mature Granule Cell Dominates Recruitment in Hippocampal-Associated Behaviors. *Cell Rep*, 31(4), 107551. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107551>
- Fahy, G.M., Brooke, R.T., Watson, J.P., Good, Z., Vasanaawala, S.S., Maecker, H., Leipold, M.D., Lin, D.T.S., Kobor, M.S., Horvath, S. (2019). Reversal of epigenetic aging and immunosenescent trends in humans. *Aging Cell*, 18(6), e13028. <https://doi.org/10.1111/accel.13028>
- Fahy, G. M., Wowk, B., Pagotan, R., Chang, A., Phan, J., Thomson, B., & Phan, L. (2009). Physical and biological aspects of renal vitrification. *Organogenesis*, 5(3), 167–175. <https://doi.org/10.4161/org.5.3.9974>
- Faulk, C., Dolinoy, D.C. (2011). Timing is everything: the when and how of environmentally induced changes in the epigenome of animals. *Epigenetics*, 6(7), 791-7. <https://doi.org/10.4161/epi.6.7.16209>
- Favreau, C., Dubosclard, E., Ostlund, C., Vigouroux, C., Capeau, J., Wehnert, M., Higuete, D., Worman, H.J., Courvalin, J.C., Buendia, B. (2003). Expression of lamin A mutated in the carboxyl-terminal tail generates an aberrant nuclear phenotype similar to that observed in cells from patients with Dunnigan-type partial lipodystrophy and Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Exp Cell Res*, 282(1), 14-23. <https://doi.org/10.1006/excr.2002.5669>
- Fernandez-Albert, J., Lipinski, M., Lopez-Cascales, M.T., Rowley, M.J., Martin-Gonzalez, A.M., Del Blanco, B., Corces, V.G., Barco, A. (2019). Immediate and deferred epigenomic signatures of *in vivo* neuronal activation in mouse hippocampus. *Nat Neurosci*, 22(10), 1718-1730. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0476-2>

- Fischer, W., Chen, K.S., Gage, F.H., Björklund, A. (1992). Progressive decline in spatial learning and integrity of forebrain cholinergic neurons in rats during aging. *Neurobiol Aging*, *13*(1), 9-23. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(92\)90003-g](https://doi.org/10.1016/0197-4580(92)90003-g)
- Foster, T.C., McNaughton, B.L. (1991). Long-term enhancement of CA1 synaptic transmission is due to increased quantal size, not quantal content. *Hippocampus*, *1*(1), 79-91. <https://doi.org/10.1002/hipo.450010108>
- French, A.J., Adams, C.A., Anderson, L.S., Kitchen, J.R., Hughes, M.R., Wood, S.H. (2008). Development of human cloned blastocysts following somatic cell nuclear transfer with adult fibroblasts. *Stem Cells*, *26*(2), 485–493.
- Frischknecht, R., Gundelfinger, E.D. (2012). The brain's extracellular matrix and its role in synaptic plasticity. *Adv Exp Med Biol*, *970*, 153-71. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0932-8_7
- Frost, J.L., Schafer, D.P. (2016). Microglia: Architects of the Developing Nervous System. *Trends Cell Biol*, *26*(8), 587-597. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.02.006>
- Fünfschilling, U., Supplie, L. M., Mahad, D., Boretius, S., Saab, A. S., Edgar, J., Brinkmann, B. G., Kassmann, C. M., Tzvetanova, I. D., Möbius, W., Diaz, F., Meijer, D., Suter, U., Hamprecht, B., Sereda, M. W., Moraes, C. T., Frahm, J., Goebbels, S., & Nave, K. A. (2012). Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature*, *485*(7399), 517–521. <https://doi.org/10.1038/nature11007>
- Gallistel, C.R. (2017). The Coding Question. *Trends Cogn Sci*, *21*(7), 498-508. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2017.04.012>
- Ganeshina, O., Berry, R. W., Petralia, R. S., Nicholson, D. A., & Geinisman, Y. (2004). Differences in the expression of AMPA and NMDA receptors between axospinous perforated and nonperforated synapses are related to the configuration and size of postsynaptic densities. *The Journal of comparative neurology*, *468*(1), 86–95. <https://doi.org/10.1002/cne.10950>
- Gao, X., Kim, K.S., Liu, D. (2007). Nonviral gene delivery: what we know and what is next. *AAPS J*, *9*(1), E92-104. <https://doi.org/10.1208/aapsj0901009>
- Geinisman, Y., Ganeshina, O., Yoshida, R., Berry, R. W., Disterhoft, J. F., & Gallagher, M. (2004). Aging, spatial learning, and total synapse number in the rat CA1 stratum radiatum. *Neurobiology of aging*, *25*(3), 407–416. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2003.12.001>
- Gershman, S.J., Balbi, P.E., Gallistel, C.R., Gunawardena, J. (2021). Reconsidering the evidence for learning in single cells. *Elife*, *10*, e61907. <https://doi.org/10.7554/eLife.61907>
- Giacca M. (2007). Virus-mediated gene transfer to induce therapeutic angiogenesis: where do we stand?. *International journal of nanomedicine*, *2*(4), 527–540.
- Giwa, S., Lewis, J. K., Alvarez, L., Langer, R., Roth, A. E., Church, G. M., Markmann, J. F., Sachs, D. H., Chandraker, A., Wertheim, J. A., Rothblatt, M., Boyden, E. S., Eidbo, E., Lee, W.

- P. A., Pomahac, B., Brandacher, G., Weinstock, D. M., Elliott, G., Nelson, D., Acker, J. P., ... Toner, M. (2017). The promise of organ and tissue preservation to transform medicine. *Nature biotechnology*, *35*(6), 530–542. <https://doi.org/10.1038/nbt.3889>
- Gold, A.R., Glanzman, D.L. (2021). The central importance of nuclear mechanisms in the storage of memory. *Biochem Biophys Res Commun*, *564*, 103-113. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.04.125>
- Goulart, B.K., de Lima, M.N., de Farias, C.B., Reolon, G.K., Almeida, V.R., Quevedo, J., Kapczinski, F., Schröder, N., Roesler, R. (2010). Ketamine impairs recognition memory consolidation and prevents learning-induced increase in hippocampal brain-derived neurotrophic factor levels. *Neuroscience*, *167*(4), 969-73. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.03.032>
- Graham, F.L., Prevec, L. (1992). Adenovirus-based expression vectors and recombinant vaccines, p. 363-390. In R. W. Ellis (ed.), *Vaccines: new approaches to immunological problems*. Butterworth-Heinemann, Boston.
- Greer, E. L., Maures, T. J., Hauswirth, A. G., Green, E. M., Leeman, D. S., Maro, G. S., Han, S., Banko, M. R., Gozani, O., & Brunet, A. (2010). Members of the H3K4 trimethylation complex regulate lifespan in a germline-dependent manner in *C. elegans*. *Nature*, *466*(7304), 383–387. <https://doi.org/10.1038/nature09195>
- Gruenbaum, Y., Margalit, A., Goldman, R.D., Shumaker, D.K., Wilson, K.L. (2005). The nuclear lamina comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *6*(1), 21-31. <https://doi.org/10.1038/nrm1550>
- Gurdon, J.B. (2006). From nuclear transfer to nuclear reprogramming the reversal of cell differentiation. *Ann Rev Cell Dev Biol*, *22*, 1-22.
- Hachinohe, M., Hanaoka, F., & Masumoto, H. (2011). Hst3 and Hst4 histone deacetylases regulate replicative lifespan by preventing genome instability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, *16*(4), 467–477. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2011.01493.x>
- Hammond, R.S., Tull, L.E., Stackman, R.W. (2004). On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem*, *82*(1), 26-34. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2004.03.005>
- Hara, Y., Park, C. S., Janssen, W. G., Punsoni, M., Rapp, P. R., & Morrison, J. H. (2011). Synaptic characteristics of dentate gyrus axonal boutons and their relationships with aging, menopause, and memory in female rhesus monkeys. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *31*(21), 7737–7744. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0822-11.2011>
- Harris K. M. (1999). Structure, development, and plasticity of dendritic spines. *Current opinion in neurobiology*, *9*(3), 343–348. [https://doi.org/10.1016/s0959-4388\(99\)80050-6](https://doi.org/10.1016/s0959-4388(99)80050-6)

- Haskins, A.L., Yonelinas, A.P., Quamme, J.R., Ranganath, C. (2008). Perirhinal cortex supports encoding and familiarity-based recognition of novel associations. *Neuron*, *59*(4), 554-60. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.07.035>
- Hassan, B.A., Hiesinger, P.R. (2015). Beyond Molecular Codes: Simple Rules to Wire Complex Brains. *Cell*, *163*(2), 285-91. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.031>
- Hayflick, L. (1985). Theories of biological aging. *Experimental gerontology*, *20*(3-4), 145–159. [https://doi.org/10.1016/0531-5565\(85\)90032-4](https://doi.org/10.1016/0531-5565(85)90032-4)
- Hayflick L. (2007). Entropy explains aging, genetic determinism explains longevity, and undefined terminology explains misunderstanding both. *PLoS genetics*, *3*(12), e220. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030220>
- Hidaka, C., E. Milano, P. L. Leopold, J. M. Bergelson, N. R. Hackett, R. W. Finberg, T. J. Wickham, I. Kovessi, P. Roelvink, y R. G. Crystal. (1999). CAR-Dependent and CAR-Independent Pathways of Adenovirus Vector-Mediated Gene Transfer and Expression in Human Fibroblasts. *The Journal of Clinical Investigation* *103*(4), 579-87. <https://doi.org/10.1172/JCI5309>
- Hille, B. (1992). *Ionic Channels of Excitable Membranes*, Second Edition (Sunderland, MA: Sinauer Associates Inc).
- Holtmaat, A., Wilbrecht, L., Knott, G. W., Welker, E., & Svoboda, K. (2006). Experience-dependent and cell-type-specific spine growth in the neocortex. *Nature*, *441*(7096), 979–983. <https://doi.org/10.1038/nature04783>
- Horvath, S. (2013). DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol*, *14*, 3156. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-10-r115>
- Horvath, S., Pirazzini, C., Bacalini, M.G., Gentilini, D., Di Blasio, A.M., Delledonne, M., Mari, D., Arosio, B., Monti, D., Passarino, G., De Rango, F., D'Aquila, P., Giuliani, C., Marasco, E., Collino, S., Descombes, P., Garagnani, P., Franceschi, C. (2015). Decreased epigenetic age of PBMCs from Italian semi-supercentenarians and their offspring. *Aging (Albany NY)*, *7*(12), 1159-70. <https://doi.org/10.18632/aging.100861>
- Horvath, S., Raj, K. (2018). DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. *Nat Rev Genet*, *19*(6), 371-384. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0004-3>
- Horvath, S., Ritz, B.R. (2015). Increased epigenetic age and granulocyte counts in the blood of Parkinson's disease patients. *Aging (Albany NY)*, *7*(12), 1130-42. <https://doi.org/10.18632/aging.100859>
- Hydén, H. (1967). Biochemical aspects of learning and memory. *Nord Med*, *77*, 205–209.
- Ieda, M. (2013). Direct reprogramming into desired cell types by defined factors. *Keio J Med*, *62*, 74-82.

- Ieda, M., Fu, D.J., Delgado-Olguin, P., Vedantham, V., Hayashi, Y., *et al.* (2010). Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell*, *142*, 375-386.
- Iwamura, E., Yamada, K., Ichitani, Y. (2016). Involvement of hippocampal NMDA receptors in retrieval of spontaneous object recognition memory in rats. *Behav Brain Res*, *307*, 92-9. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.03.048>
- Jaeger, B.N., Linker, S.B., Parylak, S.L., Barron, J.J., Gallina, I.S., Saavedra, C.D., Fitzpatrick, C., Lim, C.K., Schafer, S.T., Lacar, B., Jessberger, S., Gage, F.H. (2018). A novel environment-evoked transcriptional signature predicts reactivity in single dentate granule neurons. *Nat Commun*, *9*(1), 3084. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05418-8>
- Jin, K. (2010). Modern Biological Theories of Aging. *Aging and disease*, *1*(2), 72–74.
- Josselyn, S.A., and Frankland, P.W. (2018). Memory Allocation: Mechanisms and Function. *Annu. Rev. Neurosci*, *41*, 389–413.
- Kandel, E.R., Dudai, Y., Mayford, M.R. (2014). The molecular and systems biology of memory. *Cell*, *157*(1), 163-86. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.001>
- Karl, C., Couillard-Despres, S., Prang, P., Munding, M., Kilb, W., Brigadski, T., Plötz, S., Mages, W., Luhmann, H., Winkler, J., Bogdahn, U., Aigner, L. (2005). Neuronal precursor-specific activity of a human doublecortin regulatory sequence. *J Neurochem*, *92*(2), 264-82. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02879.x>
- Kasai, H., Hayama, T., Ishikawa, M., Watanabe, S., Yagishita, S., & Noguchi, J. (2010). Learning rules and persistence of dendritic spines. *The European journal of neuroscience*, *32*(2), 241–249. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07344.x>
- Kasai, H., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Yasumatsu, N., & Nakahara, H. (2003). Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends in neurosciences*, *26*(7), 360–368. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(03\)00162-0](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(03)00162-0)
- Katayose, D., Seth, P. (1999). Chapter 10: Development of adenoviral vectors for gene therapy. In: Seth P. (ed.), *Adenoviruses: Basic Biology to Gene Therapy*. R.G. Landers Company, Austin, TX, pp. 91–101.
- Kee, N., Teixeira, C.M., Wang, A.H., Frankland, P.W. (2007). Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus. *Nat Neurosci*, *10*(3), 355-62. <https://doi.org/10.1038/nn1847>
- Kesner, R.P., Kirk, R.A., Yu, Z., Polansky, C., Musso, N.D. (2016). Dentate gyrus supports slope recognition memory, shades of grey-context pattern separation and recognition memory, and CA3 supports pattern completion for object memory. *Neurobiol Learn Mem*, *129*, 29-37. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2015.08.010>
- Kim, J., Ambasudhan, R., Ding, S. (2012). Direct lineage reprogramming to neural cells. *Curr Opin Neurobiol*, *22*(5), 778-84. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2012.05.001>

- Kim, J., Efe, J.A., Zhu, S., Talantova, M., Yuan, X., Wang, S., Lipton, S.A., Zhang, K., Ding, S. (2011). Direct reprogramming of mouse fibroblasts to neural progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108*(19), 7838-43. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103113108>
- Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C. B., West, M. D., Ho, P. L., Coviello, G. M., Wright, W. E., Weinrich, S. L., & Shay, J. W. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science (New York, N.Y.)*, *266*(5193), 2011–2015. <https://doi.org/10.1126/science.7605428>
- Kirkwood T.B. (2005). Understanding the odd science of aging. *Cell*, *120*(4), 437–447. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.027>
- Kirkwood, T.B., & Shanley, D.P. (2010). The connections between general and reproductive senescence and the evolutionary basis of menopause. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1204*, 21–29. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05520.x>
- Krasnykh, V. N., Douglas, J. T., & van Beusechem, V. W. (2000). Genetic targeting of adenoviral vectors. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, *1*(5 Pt 1), 391–405. <https://doi.org/10.1006/mthe.2000.0062>
- Kreutzberg, G.W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*, *19*(8), 312-8. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(96\)10049-7](https://doi.org/10.1016/0166-2236(96)10049-7)
- Kyrke-Smith, M., Williams, J.M. (2018). Bridging Synaptic and Epigenetic Maintenance Mechanisms of the Engram. *Front Mol Neurosci*, *11*, 369. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00369>
- Labbadia, J., & Morimoto, R. I. (2015). The biology of proteostasis in aging and disease. *Annual review of biochemistry*, *84*, 435–464. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-033955>
- Lapasset, L., Milhabet, O., Prieur, A., Besnard, E., Babled, A., Aït-Hamou, N., Leschik, J., Pellestor, F., Ramirez, J.M., De Vos, J., Lehmann, S., Lemaitre, J.M. (2011). Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state. *Genes Dev*, *25*(21), 2248-53. <https://doi.org/10.1101/gad.173922.111>
- Lehmann, M., Canatelli-Mallat, M., Chiavellini, P., Morel, G. R., Reggiani, P. C., Hereñú, C. B., & Goya, R. G. (2019). Regulatable adenovector harboring the GFP and Yamanaka genes for implementing regenerative medicine in the brain. *Gene Therapy*, *26*(10–11). <https://doi.org/10.1038/s41434-019-0063-x>
- Lentz, T. B., Gray, S. J., & Samulski, R. J. (2012). Viral vectors for gene delivery to the central nervous system. *Neurobiology of disease*, *48*(2), 179–188. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.09.014>
- Lisman, J., Cooper, K., Sehgal, M., and Silva, A.J. (2018). Memory formation depends on both synapse-specific modifications of synaptic strength and cell-specific increases in excitability. *Nat. Neurosci*, *21*, 309–314.

- Liu, L., van Groen, T., Kadish, I., Tollefsbol, T.O. (2009). DNA methylation impacts on learning and memory in aging. *Neurobiol Aging*, 30(4), 549-60. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.07.020>
- Liu, X., Ramirez, S., Pang, P.T., Puryear, C.B., Govindarajan, A., Deisseroth, K., Tonegawa, S.P. (2012). Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall. *Nature*, 484, 381–385. <https://doi.org/10.1038/nature11028>
- López-Otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6), 1194-217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>
- Lu, Y., Brommer, B., Tian, X., Krishnan, A., Meer, M., Wang, C., Vera, D.L., Zeng, Q., Yu, D., Bonkowski, M.S., Yang, J.H., Zhou, S., Hoffmann, E.M., Karg, M.M., Schultz, M.B., Kane, A.E., Davidsohn, N., Korobkina, E., Chwalek, K., Rajman, L.A., Church, G.M., Hochedlinger, K., Gladyshev, V.N., Horvath, S., Levine, M.E., Gregory-Ksander, M.S., Ksander, B.R., He, Z., Sinclair, D.A. (2020). Reprogramming to recover youthful epigenetic information and restore vision. *Nature*, 588(7836), 124-129. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2975-4>
- Lyons-Warren, A., Lillie, R., & Hershey, T. (2004). Short- and long-term spatial delayed response performance across the lifespan. *Developmental neuropsychology*, 26(3), 661–678. https://doi.org/10.1207/s15326942dn2603_1
- Ma, T., Xie, M., Laurent, T., Ding, S. (2013). Progress in the reprogramming of somatic cells. *Circ Res*, 112(3), 562-74. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.249235>
- Macip, C.C., Hasan, R., Hoznek, V., Kim, J., Metzger, L.E., Sethna, S., & Davidsohn, N. (2023). Gene Therapy Mediated Partial Reprogramming Extends Lifespan and Reverses Age-Related Changes in Aged Mice. *BioRxiv*, 2023.01.04.522507. <https://doi.org/10.1101/2023.01.04.522507>
- Mah, L.J., El-Osta, A., Karagiannis, T.C. (2010). GammaH2AX as a molecular marker of aging and disease. *Epigenetics*, 5(2), 129-36. <https://doi.org/10.4161/epi.5.2.11080>
- Manukyan, M., Singh, P.B. (2012). Epigenetic rejuvenation. *Genes Cells*, 17(5), 337-43. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2012.01595.x>
- Marco, A., Meharena, H.S., Dileep, V., Raju, R.M., Davila-Velderrain, J., Zhang, A.L., Adaikkan, C., Young, J.Z., Gao, F., Kellis, M., Tsai, L.H. (2020). Mapping the epigenomic and transcriptomic interplay during memory formation and recall in the hippocampal engram ensemble. *Nat Neurosci*, 23(12), 1606-1617. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00717-0>
- Margariti, A., Winkler, B., Karamariti, E., Zampetaki, A., Tsai, T., et al. (2012). Direct reprogramming of fibroblasts into endothelial cells capable of angiogenesis and reendothelialization in tissueengineered vessels. *Proc natl Acad Sci USA*, 109, 13793-13798.

- Marr, D. (1971). Simple memory: a theory for archicortex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 262(841), 23-81. <https://doi.org/10.1098/rstb.1971.0078>
- Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G. C., Nemoto, T., Miyashita, Y., Iino, M., & Kasai, H. (2001). Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nature neuroscience*, 4(11), 1086–1092. <https://doi.org/10.1038/nn736>
- Mattout-Drubezki, A., Gruenbaum, Y. (2003). Dynamic interactions of nuclear lamina proteins with chromatin and transcriptional machinery. *Cell Mol Life Sci*, 60(10), 2053-63. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3038-3>
- Maza, I., Caspi, I., Zviran, A., Chomsky, E., Rais, Y., Viukov, S., Geula, S., Buenrostro, J.D., Weinberger, L., Krupalnik, V., Hanna, S., Zerbib, M., Dutton, J.R., Greenleaf, W.J., Massarwa, R., Novershtern, N., Hanna, J.H. (2015). Transient acquisition of pluripotency during somatic cell transdifferentiation with iPSC reprogramming factors. *Nat Biotechnol*, 33(7), 769-74. <https://doi.org/10.1038/nbt.3270>
- McCauley, B.S., Dang, W. (2014). Histone methylation and aging: lessons learned from model systems. *Biochim Biophys Acta*, 1839(12), 1454-62. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.05.008>
- McGuinness, J.A., Scheinert, R.B., Asokan, A., Stadler, V.C., Lee, C.S., Rani, A., Kumar, A., Foster, T.C., Ormerod, B.K. (2017). Indomethacin Increases Neurogenesis across Age Groups and Improves Delayed Probe Trial Difference Scores in Middle-Aged Rats. *Front Aging Neurosci*, 9, 280. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00280>
- McKay, B.M., Matthews, E.A., Oliveira, F.A., and Disterhoft, J.F. (2009). Intrinsic neuronal excitability is reversibly altered by a single experience in fear conditioning. *J. Neurophysiol*, 102, 2763–2770.
- Meer, M.V., Podolskiy, D.I., Tyshkovskiy, A., Gladyshev, V.N. (2018). A whole lifespan mouse multi-tissue DNA methylation clock. *Elife*, 7, e40675. <https://doi.org/10.7554/eLife.40675>
- Miranda, M., Kent, B.A., Morici, J.F., Gallo, F., Saksida, L.M., Bussey, T.J., Weisstaub, N., Bekinschtein, P. (2018). NMDA receptors and BDNF are necessary for discrimination of overlapping spatial and non-spatial memories in perirhinal cortex and hippocampus. *Neurobiol Learn Mem*, 155, 337-343. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.08.019>
- Miranda, M., Kent, B.A., Morici, J.F., Gallo, F., Weisstaub, N.V., Saksida, L.M., Bussey, T.J., Bekinschtein, P. (2017). Molecular Mechanisms in Perirhinal Cortex Selectively Necessary for Discrimination of Overlapping Memories, but Independent of Memory Persistence. *eNeuro*, 4(5), ENEURO.0293-17.2017. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0293-17.2017>
- Moore, T. L., Killiany, R. J., Herndon, J. G., Rosene, D. L., & Moss, M. B. (2006). Executive system dysfunction occurs as early as middle-age in the rhesus monkey. *Neurobiology of aging*, 27(10), 1484–1493. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.08.004>

- Morel, G.R., Andersen, T., Pardo, J., Zuccolilli, G.O., Cambiaggi, V.L., Hereñú, C.B., Goya, R.G. (2015). Cognitive impairment and morphological changes in the dorsal hippocampus of very old female rats. *Neuroscience*, 303, 189-99. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.06.050>
- Mounkes, L.C., Stewart, C.L. (2004). Aging and nuclear organization: lamins and progeria. *Curr Opin Cell Biol*, 16(3), 322-7. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.03.009>
- Mozzachiodi, R., Lorenzetti, F.D., Baxter, D.A., and Byrne, J.H. (2008). Changes in neuronal excitability serve as a mechanism of long-term memory for operant conditioning. *Nat. Neurosci*, 11, 1146–1148.
- Mukherjee, K., Twyman, R. M., & Vilcinskas, A. (2015). Insects as models to study the epigenetic basis of disease. *Progress in biophysics and molecular biology*, 118(1-2), 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2015.02.009>
- Nacher, J., Alonso-Llosa, G., Rosell, D.R., McEwen, B.S. (2003). NMDA receptor antagonist treatment increases the production of new neurons in the aged rat hippocampus. *Neurobiol Aging*, 24(2), 273-84. [https://doi.org/10.1016/s0197-4580\(02\)00096-9](https://doi.org/10.1016/s0197-4580(02)00096-9)
- Neumann, H., Kotter, M.R., Franklin, R.J. (2009). Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. *Brain*, 132(Pt2), 288-95. <https://doi.org/10.1093/brain/awn109>
- Nikonenko, I., Jourdain, P., Alberi, S., Toni, N., & Muller, D. (2002). Activity-induced changes of spine morphology. *Hippocampus*, 12(5), 585–591. <https://doi.org/10.1002/hipo.10095>
- Nili, E., Cojocaru, G.S., Kalma, Y., Ginsberg, D., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Berger, R., Shaklai, S., Amariglio, N., Brok-Simoni, F., Simon, A.J., Rechavi, G. (2001). Nuclear membrane protein LAP2beta mediates transcriptional repression alone and together with its binding partner GCL (germ-cell-less). *J Cell Sci*, 114(Pt 18), 3297-307. <https://doi.org/10.1242/jcs.114.18.3297>
- Noon, A.T., Goodarzi, A.A. (2011). 53BP1-mediated DNA double strand break repair: insert bad pun here. *DNA Repair (Amst)*, 10(10), 1071-6. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2011.07.012>
- Ocampo, A., Reddy, P., Martinez-Redondo, P., Platero-Luengo, A., Hatanaka, F., Hishida, T., Li, M., Lam, D., Kurita, M., Beyret, E., Araoka, T., Vazquez-Ferrer, E., Donoso, D., Roman, J.L., Xu, J., Rodriguez Esteban, C., Nuñez, G., Nuñez Delicado, E., Campistol, J.M., Guillen, I., Guillen, P., Izpisua Belmonte, J.C. (2016). *In vivo* Amelioration of Age-Associated Hallmarks by Partial Reprogramming. *Cell*, 167(7), 1719-1733.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.052>
- Ognibene, A., Sabatelli, P., Petrini, S., Squarzone, S., Riccio, M., Santi, S., Villanova, M., Palmeri, S., Merlini, L., Maraldi, N.M. (1999). Nuclear changes in a case of X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Muscle Nerve*, 22(7), 864-9. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4598\(199907\)22:7<864::aid-mus8>3.0.co;2-g](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4598(199907)22:7<864::aid-mus8>3.0.co;2-g)

- Okano, H., Nakamura, M., Yoshida, K., Okada, Y., Tsuji, O., Nori, S., Ikeda, E., Yamanaka, S., Miura, K. (2013). Steps toward safe cell therapy using induced pluripotent stem cells. *Circ Res*, *112*(3), 523-33. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.256149>
- Oliveira, A. M., Hawk, J. D., Abel, T., & Havekes, R. (2010). Post-training reversible inactivation of the hippocampus enhances novel object recognition memory. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, *17*(3), 155–160. <https://doi.org/10.1101/lm.1625310>
- Olova, N., Simpson, D. J., Marioni, R. E., & Chandra, T. (2019). Partial reprogramming induces a steady decline in epigenetic age before loss of somatic identity. *Aging cell*, *18*(1), e12877. <https://doi.org/10.1111/acel.12877>
- Olovnikov, A. M. (1973). A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *Journal of theoretical biology*, *41*(1), 181–190. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(73\)90198-7](https://doi.org/10.1016/0022-5193(73)90198-7)
- O'Reilly, R.C., McClelland, J.L. (1994). Hippocampal conjunctive encoding, storage, and recall: avoiding a trade-off. *Hippocampus*, *4*(6), 661-82. <https://doi.org/10.1002/hipo.450040605>
- Ortega-de San Luis, C., Ryan, T.J. (2022). Understanding the physical basis of memory: Molecular mechanisms of the engram. *J Biol Chem*, *298*(5), 101866. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101866>
- Pan, S., Mayoral, S.R., Choi, H.S., Chan, J.R., Kheirbek, M.A. (2020). Preservation of a remote fear memory requires new myelin formation. *Nat Neurosci*, *23*(4), 487-499. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0582-1>
- Panier, S., Boulton, S.J. (2014). Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *15*(1), 7-18. <https://doi.org/10.1038/nrm3719>
- Pardo, J., Abba, M.C., Lacunza, E., Francelle, L., Morel, G.R., Outeiro, T.F., Goya, R.G. (2017). Identification of a conserved gene signature associated with an exacerbated inflammatory environment in the hippocampus of aging rats. *Hippocampus*, *27*(4), 435-449. <https://doi.org/10.1002/hipo.22703>
- Passano, M.L. (1957). Prey-predator recognition in the lower vertebrates (Eugene: University of Oregon Press).
- Patil, S.D., Rhodes, D.G., Burgess, D.J. (2005). DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: a comprehensive review. *AAPS J.*, *7*(1), E61-77. <https://doi.org/10.1208/aapsj070109>
- Paxinos, G., Watson, C. (2007). The rat brain in stereotaxic coordinates. *Sixth Edition*.
- Perry, V.H., Nicoll, J.A., Holmes, C. (2010). Microglia in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol*, *6*(4), 193-201. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2010.17>

- Petkovich, D.A., Podolskiy, D.I., Lobanov, A.V., Lee, S.G., Miller, R.A., Gladyshev, V.N. (2017). Using DNA Methylation Profiling to Evaluate Biological Age and Longevity Interventions. *Cell Metab*, 25(4), 954-960, e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.03.016>
- Petralia, R. S., Mattson, M. P., & Yao, P. J. (2014). Communication breakdown: the impact of ageing on synapse structure. *Ageing research reviews*, 14, 31–42. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2014.01.003>
- Pietá Días, C., Martins de Lima, M.N., Presti-Torres, J., Dornelles, A., Garcia, V.A., Siciliani Scalco, F., Rewsaat Guimarães, M., Constantino, L., Budni, P., Dal-Pizzol, F., Schröder, N. (2007). Memantine reduces oxidative damage and enhances long-term recognition memory in aged rats. *Neuroscience*, 146(4), 1719-25. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.03.018>
- Pignatelli, M., Ryan, T.J., Roy, D.S., Lovett, C., Smith, L.M., Muralidhar, S., Tonegawa, S. (2019). Engram Cell Excitability State Determines the Efficacy of Memory Retrieval. *Neuron*, 101(2), 274-284, e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.11.029>
- Pitsikas, N., Rigamonti, A.E., Cella, S.G., Sakellaridis, N., Muller, E.E. (2005). The nitric oxide donor molsidomine antagonizes age-related memory deficits in the rat. *Neurobiol Aging*, 26(2), 259-64. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2004.04.003>
- Potier, B., Poindessous-Jazat, F., Dutar, P., & Billard, J. M. (2000). NMDA receptor activation in the aged rat hippocampus. *Experimental gerontology*, 35(9-10), 1185–1199. [https://doi.org/10.1016/s0531-5565\(00\)00122-4](https://doi.org/10.1016/s0531-5565(00)00122-4)
- Powers, E. T., Morimoto, R. I., Dillin, A., Kelly, J. W., & Balch, W. E. (2009). Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. *Annual review of biochemistry*, 78, 959–991. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.052308.114844>
- Preuss, T. M., & Wise, S. P. (2022). Evolution of prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 47(1), 3–19. <https://doi.org/10.1038/s41386-021-01076-5>
- Raj, K. (2018). Chapter 4 – The Epigenetic Clock and Aging. Epigenetics of Aging and Longevity. *Translational Epigenetics*, 4, 95-118. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/B978-0-12-811060-7.00004-8](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811060-7.00004-8)
- Raman, D.V., O'Leary, T. (2021). Optimal plasticity for memory maintenance during ongoing synaptic change. *Elife*, 10, e62912. <https://doi.org/10.7554/eLife.62912>
- Randall, P.A., Pardo, M., Nunes, E.J., López Cruz, L., Vemuri, V.K., Makriyannis, A., Baqi, Y., Müller, C.E., Correa, M., Salamone, J.D. (2012). Dopaminergic modulation of effort-related choice behavior as assessed by a progressive ratio chow feeding choice task: pharmacological studies and the role of individual differences. *PLoS One*, 7(10), e47934. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047934>

- Rando, T.A., Chang, H.Y. (2012). Aging, rejuvenation, and epigenetic reprogramming: resetting the aging clock. *Cell*, *148*(1-2), 46-57. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.003>
- Rao, M.S., Hattiangady, B., Abdel-Rahman, A., Stanley, D.P., Shetty, A.K. (2005). Newly born cells in the ageing dentate gyrus display normal migration, survival and neuronal fate choice but endure retarded early maturation. *Eur J Neurosci*, *21*(2), 464-76. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.03853.x>
- Rapp, P. R., & Amaral, D. G. (1989). Evidence for task-dependent memory dysfunction in the aged monkey. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *9*(10), 3568–3576. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.09-10-03568.1989>
- Rapp, P.R., Deroche, P.S., Mao, Y., Burwell, R.D. (2002). Neuron number in the parahippocampal region is preserved in aged rats with spatial learning deficits. *Cereb Cortex*, *12*(11), 1171-9. <https://doi.org/10.1093/cercor/12.11.1171>
- Rapp, P.R., Gallagher, M. (1996). Preserved neuron number in the hippocampus of aged rats with spatial learning deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *93*(18), 9926-30. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.18.9926>
- Rashid, A.J., Yan, C., Mercaldo, V., Hsiang, H.L., Park, S., Cole, C.J., De Cristofaro, A., Yu, J., Ramakrishnan, C., Lee, S.Y., Deisseroth, K., Frankland, P.W., Josselyn, S.A. (2016). Competition between engrams influences fear memory formation and recall. *Science*, *353*(6297), 383-7. <https://doi.org/10.1126/science.aaf0594>
- Rasmussen, T., Schliemann, T., Sørensen, J.C., Zimmer, J., West, M.J. (1996). Memory impaired aged rats: no loss of principal hippocampal and subicular neurons. *Neurobiol Aging*, *17*(1), 143-7. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(95\)02032-2](https://doi.org/10.1016/0197-4580(95)02032-2)
- Redon, C., Pilch, D., Rogakou, E., Sedelnikova, O., Newrock, K., Bonner, W. (2002). Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr Opin Genet Dev*, *12*(2), 162-9. [https://doi.org/10.1016/s0959-437x\(02\)00282-4](https://doi.org/10.1016/s0959-437x(02)00282-4)
- Riccio, D.C., Richardson, R., & Ebner, D. L. (1984). Memory retrieval deficits based upon altered contextual cues: A paradox. *Psychological Bulletin*, *96*(1), 152–165. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.96.1.152>
- Robins, S.K. (2017). Memory traces. In: Bernecker S, Michaelian K, eds. *The Routledge handbook of philosophy of memory*. London: Routledge, 76-87.
- Rodríguez-Matellán, A., Alcazar, N., Hernández, F., Serrano, M., Ávila, J. (2020). *In vivo* Reprogramming Ameliorates Aging Features in Dentate Gyrus Cells and Improves Memory in Mice. *Stem Cell Reports*, *15*(5), 1056-1066. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.09.010>
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., Bonner, W.M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*, *273*(10), 5858-68. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.10.5858>

- Rosene, D.L., Nicholson, T.J. (1999). Neurotransmitter Receptor Changes in the Hippocampus and Cerebral Cortex in Normal Aging. In: Peters, A., Morrison, J.H. (eds) *Cerebral Cortex*. Cerebral Cortex, vol 14. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4885-0_6
- Rosewell, A., Vetrini, F., & Ng, P. (2011). Helper-Dependent Adenoviral Vectors. *Journal of genetic syndromes & gene therapy, Suppl 5*, 001. <https://doi.org/10.4172/2157-7412.s5-001>
- Rothkamm, K., Barnard, S., Moquet, J., Ellender, M., Rana, Z., Burdak-Rothkamm, S. (2015). DNA damage foci: Meaning and significance. *Environ Mol Mutagen*, 56(6), 491-504. <https://doi.org/10.1002/em.21944>
- Ryan, T.J., Roy, D.S., Pignatelli, M., Arons, A., Tonegawa, S. (2015). Memory. Engram cells retain memory under retrograde amnesia. *Science*, 348(6238), 1007-13. <https://doi.org/10.1126/science.aaa5542>
- Sahay, A., Scobie, K.N., Hill, A.S., O'Carroll, C.M., Kheirbek, M.A., Burghardt, N.S., Fenton, A.A., Dranovsky, A., Hen, R. (2011). Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature*, 472(7344), 466-70. <https://doi.org/10.1038/nature09817>
- Sale, A., Maya Vetencourt, J. F., Medini, P., Cenni, M. C., Baroncelli, L., De Pasquale, R., Maffei, L. (2007). Environmental enrichment in adulthood promotes amblyopia recovery through a reduction of intracortical inhibition. *Nat. Neurosci*, 10, 679–681.
- Sanchez, H.L., Silva, L.B., Portiansky, E.L., Goya, R.G., Zuccolilli, G.O. (2003). Impact of very old age on hypothalamic dopaminergic neurons in the female rat: a morphometric study. *J Comp Neurol*, 458(4), 319-25. <https://doi.org/10.1002/cne.10564>
- Sanchez, H.L., Silva, L.B., Portiansky, E.L., Herenu, C.B., Goya, R.G., Zuccolilli, GO. (2008). Dopaminergic mesencephalic systems and behavioral performance in very old rats. *Neuroscience*, 154(4), 1598-606. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.04.016>
- Sancho-Martinez, I., Baek, S.H., Izpisua Belmonte, J.C. (2012). Lineage conversion methodologies meet the reprogramming toolbox. *Nat Cell Biol*, 14, 892-899.
- Sarkar, T. J., Quarta, M., Mukherjee, S., Colville, A., Paine, P., Doan, L., Tran, C. M., Chu, C. R., Horvath, S., Qi, L. S., Bhutani, N., Rando, T. A., & Sebastiano, V. (2020). Transient non-integrative expression of nuclear reprogramming factors promotes multifaceted amelioration of aging in human cells. *Nature communications*, 11(1), 1545. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15174-3>
- Schaffer, D.V., Koerber, J.T., Lim, K. (2008). Molecular Engineering of Viral Gene Delivery Vehicles. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 10, 169-94. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.10.061807.160514>
- Scheff, S.W., Price, D.A. (2003). Synaptic pathology in Alzheimer's disease: A review of ultrastructural studies. *Neurobiol Aging*, 24, 1029–1046.

- Schrader, L.A., Anderson, A.E., Varga, A.W., Levy, M., and Sweatt, J.D. (2002). The other half of Hebb: K⁺ channels and the regulation of neuronal excitability in the hippocampus. *Mol. Neurobiol*, 25, 51–66.
- Schwartz, M., Kipnis, J., Rivest, S., Prat, A. (2013). How do immune cells support and shape the brain in health, disease, and aging? *J Neurosci*, 33(45), 17587-96. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3241-13.2013>
- Sedelnikova, O.A., Horikawa, I., Zimonjic, D.B., Popescu, N.C., Bonner, W.M., Barrett, J.C. (2004). Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unrepairable double-strand breaks. *Nat Cell Biol*, 6(2), 168-70. <https://doi.org/10.1038/ncb1095>
- Sedelnikova, O.A., Rogakou, E.P., Panyutin, I.G., Bonner, W.M. (2002). Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiat Res*, 158(4), 486-92. [https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2002\)158\[0486:qdoiid\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2002)158[0486:qdoiid]2.0.co;2)
- Sen, P., Dang, W., Donahue, G., Dai, J., Dorsey, J., Cao, X., Liu, W., Cao, K., Perry, R., Lee, J. Y., Wasko, B. M., Carr, D. T., He, C., Robison, B., Wagner, J., Gregory, B. D., Kaeberlein, M., Kennedy, B. K., Boeke, J. D., & Berger, S. L. (2015). H3K36 methylation promotes longevity by enhancing transcriptional fidelity. *Genes & development*, 29(13), 1362–1376. <https://doi.org/10.1101/gad.263707.115>
- Shayakhmetov, D. M., Gaggar, A., Ni, S., Li, Z. Y., & Lieber, A. (2005). Adenovirus binding to blood factors results in liver cell infection and hepatotoxicity. *Journal of virology*, 79(12), 7478–7491. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.12.7478-7491.2005>
- Sharaf, A., Kriegelstein, K., & Spittau, B. (2013). Distribution of microglia in the postnatal murine nigrostriatal system. *Cell and tissue research*, 351(3), 373–382. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1537-y>
- Shi, L., Adams, M., & Brunso-Bechtold, J. K. (2007). Subtle Alterations in Glutamatergic Synapses Underlie the Aging-Related Decline in Hippocampal Function. In D. R. Riddle (Ed.), *Brain Aging: Models, Methods, and Mechanisms*. CRC Press/Taylor & Francis.
- Shi, L., Argenta, A.E., Winseck, A.K., Brunso-Bechtold, J.K. (2004). Stereological quantification of GAD-67-immunoreactive neurons and boutons in the hippocampus of middle-aged and old Fischer 344 x Brown Norway rats. *J Comp Neurol*, 478(3), 282-91. <https://doi.org/10.1002/cne.20303>
- Simpson, D. J., Olova, N. N., & Chandra, T. (2021). Cellular reprogramming and epigenetic rejuvenation. *Clinical epigenetics*, 13(1), 170. <https://doi.org/10.1186/s13148-021-01158-7>
- Sofroniew, M.V., Vinters, H.V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*, 119(1), 7-35. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>

- Sohal, R.S., Weindruch, R. (1996). Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science*, 273(5271), 59-63. <https://doi.org/10.1126/science.273.5271.59>
- Somech, R., Shaklai, S., Geller, O., Amariglio, N., Simon, A.J., Rechavi, G., Gal-Yam, E.N. (2005). The nuclear-envelope protein and transcriptional repressor LAP2beta interacts with HDAC3 at the nuclear periphery, and induces histone H4 deacetylation. *J Cell Sci*, 118(Pt 17), 4017-25. <https://doi.org/10.1242/jcs.02521>
- Sommer, C. A., Stadtfeld, M., Murphy, G. J., Hochedlinger, K., Kotton, D. N., & Mostoslavsky, G. (2009). Induced Pluripotent Stem Cell Generation Using a Single Lentiviral Stem Cell Cassette EMBRYONIC STEM CELLS/INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS Induced Pluripotent Stem Cell Generation Using a Single Lentiviral Stem Cell Cassette. *STEM CELLS*, 27, 543–549. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-1075>
- Soreq, L., UK Brain Expression Consortium, North American Brain Expression Consortium, Rose, J., Soreq, E., Hardy, J., Trabzuni, D., Cookson, M.R., Smith, C., Ryten, M., Patani, R., Ule, J. (2017). Major Shifts in Glial Regional Identity Are a Transcriptional Hallmark of Human Brain Aging. *Cell Rep*, 18(2), 557-570. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.011>
- Spann, T.P., Goldman, A.E., Wang, C., Huang, S., Goldman, R.D. (2002). Alteration of nuclear lamin organization inhibits RNA polymerase II-dependent transcription. *J Cell Biol*, 156(4), 603-8. <https://doi.org/10.1083/jcb.200112047>
- Spann, T.P., Moir, R.D., Goldman, A.E., Stick, R., Goldman, R.D. (1997). Disruption of nuclear lamin organization alters the distribution of replication factors and inhibits DNA synthesis. *J Cell Biol*, 136(6), 1201-12. <https://doi.org/10.1083/jcb.136.6.1201>
- Squire, L.R. (1992). Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol. Rev.*, 99, 195–231.
- Squire, L.R., Genzel, L., Wixted, J.T., Morris, R.G. (2015). Memory consolidation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7(8), a021766. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021766>
- Squire, L.R., Zola-Morgan, S. (1991). The medial temporal lobe memory system. *Science*, 253(5026), 1380-6. <https://doi.org/10.1126/science.1896849>
- Squire, L.R., Zola-Morgan, S. (1996). Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(24), 13515-22. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.24.13515>
- Steadman, P.E., Xia, F., Ahmed, M., Mocle, A.J., Penning, A.R.A., Geraghty, A.C., Steenland, H.W., Monje, M., Josselyn, S.A., Frankland, P.W. (2020). Disruption of Oligodendrogenesis Impairs Memory Consolidation in Adult Mice. *Neuron*, 105(1), 150-164.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.10.013>
- Stouffer, E.M., & Heisey, J.L. (2013). Latent learning of spatial information is impaired in middle-aged rats. *Developmental Psychobiology*, 55(3), 309–315. <https://doi.org/10.1002/dev.21021>

- Streit, W.J. (2006). Microglial senescence: does the brain's immune system have an expiration date? *Trends Neurosci*, *29*(9), 506-10. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2006.07.001>
- Streit, W.J., Mrak, R.E., Griffin, W.S. (2004). Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. *J Neuroinflammation*, *1*(1), 14. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-1-14>
- Sze, C.I., Troncoso, J.C., Kawas, C., Mouton, P., Price, D.L., Martin, L.J. (1997). Loss of the presynaptic vesicle protein synaptophysin in hippocampus correlates with cognitive decline in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, *56*(8), 933-44. <https://doi.org/10.1097/00005072-199708000-00011>
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, *13*, 861-72.
- Takahashi, K., Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, *126*(4), 663-76. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Terry, R.D., Masliah, E., Salmon, D.P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L.A., Katzman, R. (1991). Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol*, *30*(4), 572-80. <https://doi.org/10.1002/ana.410300410>
- Thompson, M.J., Chwiałkowska, K., Rubbi, L., Lusi, A.J., Davis, R.C., Srivastava, A., Korstanje, R., Churchill, G.A., Horvath, S., Pellegrini, M. (2018). A multi-tissue full lifespan epigenetic clock for mice. *Aging (Albany NY)*, *10*(10), 2832-2854. <https://doi.org/10.18632/aging.101590>
- Timiras, P.S. (1994). Degenerative changes in cells and cell death. In: Timiras, P.S. (Ed.), *Physiological Basis of Aging and Geriatrics*, second ed. CRC Press, Boca Raton, pp. 47–59.
- Toyama, B.H., Hetzer, M.W. (2013). Protein homeostasis: live long, won't prosper. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *14*(1), 55-61. <https://doi.org/10.1038/nrm3496>
- Tremblay, M.È., Lowery, R.L., Majewska, A.K. (2010). Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS Biol*, *8*(11), e1000527. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000527>
- Tremblay, M.È., Majewska, A.K. (2011). A role for microglia in synaptic plasticity? *Commun Integr Biol*, *4*(2), 220-2. <https://doi.org/10.4161/cib.4.2.14506>
- Tsien, R.Y. (2013). Very long-term memories may be stored in the pattern of holes in the perineuronal net. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(30), 12456-61. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310158110>
- Tulving, E. (2002). Episodic memory: from mind to brain. *Annu Rev Psychol*, *53*, 1-25. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.53.100901.135114>

- Ulupinar, E., Yucel, F. (2005). Prenatal stress reduces interneuronal connectivity in the rat cerebellar granular layer. *Neurotoxicol Teratol*, *27*, 475–484.
- Van Remmen, H., Richardson, A. (2001). Oxidative damage to mitochondria and aging. *Exp Gerontol*, *36*(7), 957-68. [https://doi.org/10.1016/s0531-5565\(01\)00093-6](https://doi.org/10.1016/s0531-5565(01)00093-6)
- Vannucchi, M.G., Scali, C., Kopf, S.R., Pepeu, G., Casamenti, F. (1997). Selective muscarinic antagonists differentially affect *in vivo* acetylcholine release and memory performances of young and aged rats. *Neuroscience*, *79*(3), 837-46. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(97\)00091-2](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(97)00091-2)
- Vargas-López, V., Lamprea, M.R., Múnera, A. (2011). Characterizing spatial extinction in an abbreviated version of the Barnes maze. *Behav Processes*, *86*(1), 30-8. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2010.08.002>
- Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Pang, Z.P., Kokubu, Y., Südhof, T.C., *et al.* (2010). Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature*, *463*, 1035-1041.
- Vita-More, N., & Barranco, D. (2015). Persistence of Long-Term Memory in Vitrified and Revived *Caenorhabditis elegans*. *Rejuvenation research*, *18*(5), 458–463. <https://doi.org/10.1089/rej.2014.1636>
- von Zglinicki, T. (2000). Role of oxidative stress in telomere length regulation and replicative senescence. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *908*, 99–110. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06639.x>
- Walaas, S.I., Jahn, R., Greengard, P. (1988). Quantitation of nerve terminal populations: synaptic vesicle-associated proteins as markers for synaptic density in the rat neostriatum. *Synapse*, *2*(5), 516-20. <https://doi.org/10.1002/syn.890020507>
- Walhovd, K.B., Westlye, L.T., Amlie, I., Espeseth, T., Reinvang, I., Raz, N., Agartz, I., Salat, D.H., Greve, D.N., Fischl, B., Dale, A.M., Fjell, A.M. (2011). Consistent neuroanatomical age-related volume differences across multiple samples. *Neurobiol Aging*, *32*(5), 916-32. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2009.05.013>
- Wang, D., Fawcett, J. (2012). The perineuronal net and the control of CNS plasticity. *Cell Tissue Res*, *349*(1), 147-60. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1375-y>
- Wang, T., Tsui, B., Kreisberg, J.F., Robertson, N.A., Gross, A.M., Yu, M.K., Carter, H., Brown-Borg, H.M., Adams, P.D., Ideker, T. (2017). Epigenetic aging signatures in mice livers are slowed by dwarfism, calorie restriction and rapamycin treatment. *Genome Biol*, *18*(1):57. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1186-2>
- Warburton, E.C., Brown, M.W. (2010). Findings from animals concerning when interactions between perirhinal cortex, hippocampus and medial prefrontal cortex are necessary for recognition memory. *Neuropsychologia*, *48*(8), 2262-72. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2009.12.022>

- West, M. J. (1993). New stereological methods for counting neurons. *Neurobiol. Aging*, *14*, 275–285. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(93\)90112-o](https://doi.org/10.1016/0197-4580(93)90112-o) (a)
- West, M.J. (1993). Regionally specific loss of neurons in the aging human hippocampus. *Neurobiol Aging*, *4*(4), 287-93. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(93\)90113-p](https://doi.org/10.1016/0197-4580(93)90113-p) (b)
- Wi, S., Yu, J.H., Kim, M., Cho, S.R. (2016). *In vivo* Expression of Reprogramming Factors Increases Hippocampal Neurogenesis and Synaptic Plasticity in Chronic Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *Neural Plast*, *2016:2580837*. <https://doi.org/10.1155/2016/2580837>
- Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., Campbell, K.H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, *385*, 810-3.
- Wimmer, M.E., Hernandez, P.J., Blackwell, J., Abel, T. (2012). Aging impairs hippocampus-dependent long-term memory for object location in mice. *Neurobiol Aging*, *33*(9), 2220-4. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.07.007>
- Winters, B.D., Saksida, L.M., Bussey, T.J. (2010). Implications of animal object memory research for human amnesia. *Neuropsychologia*, *48*(8), 2251-61. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2010.01.023>
- Wolf, S.A., Boddeke, H.W., Kettenmann, H. (2017). Microglia in Physiology and Disease. *Annu Rev Physiol*, *79*, 619-643. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034406>
- Wood, J. G., Jones, B. C., Jiang, N., Chang, C., Hosier, S., Wickremesinghe, P., Garcia, M., Hartnett, D. A., Burhenn, L., Neretti, N., & Helfand, S. L. (2016). Chromatin-modifying genetic interventions suppress age-associated transposable element activation and extend life span in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(40), 11277–11282. <https://doi.org/10.1073/pnas.1604621113>
- Wowk, B. (2007). How cryoprotectants work. *Cryonics/Third Quarter*, 3-7.
- Yassa, M.A., Lacy, J.W., Stark, S.M., Albert, M.S., Gallagher, M., Stark, C.E. (2011). Pattern separation deficits associated with increased hippocampal CA3 and dentate gyrus activity in nondemented older adults. *Hippocampus*, *21*(9), 968-79. <https://doi.org/10.1002/hipo.20808>
- Yeh, P., & Perricaudet, M. (1997). Advances in adenoviral vectors: from genetic engineering to their biology. *FASEB J.*, *11*, 615–623.
- Yiu, A.P., Mercaldo, V., Yan, C., Richards, B., Rashid, A.J., Hsiang, H.-L.L., Pressey, J., Mahadevan, V., Tran, M.M., Kushner, S.A., *et al.* (2014). Neurons are recruited to a memory trace based on relative neuronal excitability immediately before training. *Neuron*, *83*, 722–735.
- Zappa Villar, M.F., López Hanotte, J., Falomir Lockhart, E., Trípodí, L.S., Morel, G.R., Reggiani, P.C. (2018). Intracerebroventricular streptozotocin induces impaired Barnes maze spatial memory and reduces astrocyte branching in the CA1 and CA3 hippocampal

- regions. *J Neural Transm (Vienna)*, 125(12), 1787-1803.
<https://doi.org/10.1007/s00702-018-1928-7>
- Zhang, W., and Linden, D.J. (2003). The other side of the engram: experienced driven changes in neuronal intrinsic excitability. *Nat. Rev. Neurosci*, 4, 885–900.
- Zhou, W., Freed, C.R. (2009). Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*, 27(11), 2667-74.
<https://doi.org/10.1002/stem.201>
- Zola-Morgan, S., Squire, L.R., Ramus, S.J. (1994). Severity of memory impairment in monkeys as a function of locus and extent of damage within the medial temporal lobe memory system. *Hippocampus*, 4(4), 483-95. <https://doi.org/10.1002/hipo.450040410>
- Zou, Y., Stoeckli, E., Chen, H., Tessier-Lavigne, M. (2000). Squeezing axons out of the gray matter: a role for slit and semaphorin proteins from midline and ventral spinal cord. *Cell*, 102, 363–375.
- Zuo, Y., Lin, A., Chang, P., & Gan, W. B. (2005). Development of long-term dendritic spine stability in diverse regions of cerebral cortex. *Neuron*, 46(2), 181–189.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.04.001>