

Facultad de Ciencias Médicas
Universidad Nacional de La Plata

**Tesis para optar al
Grado de Máster en Investigaciones Médicas**

Tema:

**TERAPIAS PROTECTORAS DE LA FUNCION COGNITIVA EN EL
HIPOCAMPO DE LA RATA SENIL**

Maestrando: *Licenciada Noelia Illarreguy*

DIRECTOR: *Dr. Gustavo Ramón Morel*

LUGAR DE TRABAJO: *Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata- Cátedra de Histología B, Cátedra de Patología B, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata*

Agradecimientos

Quiero agradecer especialmente a mi familia, mi mamá y mi papá que me apoyaron en hacer realidad esta tesis. A mi novio por el apoyo. También agradezco a mi director por la paciencia y el apoyo que tuve para poder llegar hasta acá. Les doy las gracias a la directora de tesis Alicia Matiazzi por haberme apoyado y darme el tiempo que necesitaba para poder terminarla. Agradezco a la Facultad de Medicina, a CONICET e INIBIOLP por permitirme desarrollar las tareas para dicho trabajo.

Noelia.

INDICE

1.1	Introducción. Antecedentes del tema	8
1.1.1	Impacto del envejecimiento sobre el cerebro de la rata senil.....	8
1.1.2	Envejecimiento cerebral.....	8
1.1.3	Alteraciones cognitivas.....	10
1.2	Enfermedad de Alzheimer.....	11
1.2.1	Generalidades.....	11
1.2.2	Alteraciones en Enfermedad de Alzheimer.....	12
1.2.3	Aprendizaje y memoria.....	14
1.3	Definición y clasificación de memoria.....	15
1.3.1	Fases de la memoria.....	17
1.3.2	Memoria espacial en ratas.....	19
1.3.3	Memoria de separación de patrones en roedores.....	20
1.4	El Hipocampo de la rata.....	21
1.4.1	Anatomía, función y modificación en envejecimiento.....	21
1.4.2	Neurogénesis	23
1.4.3	Caracterización de las capas del nicho neurogénico del Giro Dentado.....	26
1.4.4	El circuito trisináptico del hipocampo.....	29
1.4.5	Hipocampo y corteza retroplenial, entorrinal y perirrinal en la EA.....	30
1.5	Terapia génica.....	31
1.5.1.	Generalidades.....	31
1.5.2.	Vectores adenovirales.....	33
1.5.3.	Factores tróficos.....	35
1.5.4.	Terapias protectoras de la función cognitiva.....	38
1.5.5.	La rata senil como modelo de estudio para terapias neurorestaurativas.....	38
1.6	Importancia de los astrocitos en el envejecimiento.....	39

Capítulo 1

2.1	Hipótesis.....	40
2.1.1	Objetivo general.....	40
2.1.2	Objetivos específicos.....	41
3.1	Materiales y Métodos.....	41
3.1.1	Animales.....	41
3.1.2	Evaluación comportamental para evaluar la actividad exploratoria y el estatus mnemónico de la rata MA.....	42
3.1.3	Diseño experimental.....	44
3.1.4	Eutanasia y disección de cerebros.....	48
3.1.5	Inmunohistoquímica de cerebros.....	48
3.1.6	Análisis de imágenes.....	49
3.1.7	Análisis estadísticos.....	49
4.1	Resultados.....	49
4.1.1	Objetivo 1.....	49
4.1.2	Objetivo 2.....	51
4.1.3	Objetivo 3.....	53
4.1.4	Objetivo 4.....	58
5.1	Discusión.....	60
6.1	Conclusión.....	65

Capítulo 2

7.1 Hipótesis.....	66
7.1.1Objetivos específicos	66
7.2Materiales y métodos.....	66
7.2.1Animales.....	66
7.2.2 Vectores adenovirales.....	67
7.2.3 Mantenimiento y manipulación de vectores virales.....	67
7.2.4Cirugía estereotáxica.....	67
7.2.5 Eutanasia y procesamiento de cerebros (ver sección 3.1.4).....	68
8.1Diseñoexperimental.....	68
8.2Inmunohistoquímica.....	69
8.3 Análisis de imagen.....	69
8.4 Análisis de los astrocitos hipocampales.....	69
8.4.1 Medición del área inmunorreactiva para GFAP.....	69
8.4.2 Medición de los procesos astrocitos por análisis de sholl.....	70
8.4.3 Medición del número de neuronas piramidales en CA3 por método de disector óptico.....	70
8.5 Análisis estadístico.....	71
9.1 Resultados.....	71
9.1.1 Objetivo 1.....	71
9.1.2 Objetivo 2.....	73
10.1 Discusión.....	74
11.1 Conclusión.....	76
12.1 Bibliografía	77

Abreviaturas

AD: Adenovirus

APP: Proteína precursora amiloide

asf: Fracción del muestreo del área

ATs: Ensayos de adquisición

A β : Peptido β -amiloides

BrdU: Bromodeoxiuridina

CA: Cuerno de Amón

CA1: Cornu Ammonis área 1

CA3: Cornu Ammonis" área 3

CE: Corteza entorrinal

CICUAL: Comité Institucional para el Cuidado y el Uso de Animales de Laboratorio

CM: Células moleculares

CP: Capa Polimórfica

CP: Células piramidales

CPR: Corteza perirrinal

CR: Corteza Retrospeñial

DCX: Neuronas doble cortina

DCX+: Doble cortina positiva

DG: Giro dentado

DH: Hilio dentado

DsRed: Proteína fluorescente roja

EA: Enfermedad Alzheimer

EA: Enfermedad de Alzheimer

EAe: Enfermedad de Alzheimer esporádica

EAF: Enfermedad de Alzheimer familiar

EH: Enfermedad de Huntington

EP: Enfermedad de Parkinson

GCL: Capa granular de células

GCL: Células granulares

GFAP: Proteína ácida fibrilar glial

GH: Hormona de Crecimiento

GS: Goal Sector-Sector meta

HD: Helper dependent

HP: Hipocampo

i.c.v.: intracerebroventricular

IBA 1: Molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1

IGF-1: Factor de crecimiento simil Insulina Tipo 1

IGFBPs: Proteinas transportadoras de IGF-1

IHQ: Inmunohistoquímica

LTP: Potenciación a largo plazo

MA: Mediana edad

MRF: Resonancia Magnética funcional longitudinal

MWM: Laberinto de agua de Morris

N: Número de neuroblastos

NA: Neurogenesis adulta

NeuN: Marcador del núcleo neuronal

NMDA: N-metil D-aspartato

OFT: Prueba de campo abierto

PFA: paraformaldehído

PT: Ensayo de prueba

RAds: Vectores adenovirales recombinantes

RO: Reconocimiento de objetos

RQR: Suma estimada de neuroblastos contados

SB: Subiculo

SD: Sprague Dowley

SGZ: Zona subgranular

SNC: Sistema Nervioso Central

SR: Stratum Radiatum

SVZ: Zona Subventricular

TA: Vía temporoamónica

tsf: Fracción de muestreo del espesor

VL: Ventriculos laterales

VP: Vía perforante

VPL: Vía perforante lateral

VPM: Vía perforante medial

Capítulo 1

1.1 Introducción. Antecedentes del tema

1.1.1 Impacto del envejecimiento sobre el cerebro de la rata senil

En el laboratorio se ha estudiado el impacto del envejecimiento del hipocampo en la rata hembra utilizando el laberinto de Barnes. Los resultados demostraron que la memoria de referencia declina significativamente con la edad. Este déficit progresivo en la memoria espacial se refleja en la distribución de la actividad exploratoria en la plataforma de Barnes 5 días después de los entrenamientos.

A nivel microscópico se ha observado una enorme caída en el número de neuronas doblecortina (DCX) inmunorreactivas en el giro dentado (DG) de los animales seniles, una disminución de la complejidad de los procesos en los astrocitos GFAP (proteína ácida fibrilar glial,) inmunorreactivos (Morel y col., 2015) y un aumento en el número de la microglía total Iba1 (molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1) inmunorreactivos en el stratum radiatum (Pardo y col., 2017).

A nivel molecular, se ha realizado el transcriptoma del hipocampo entero de la rata senil en comparación con la rata joven.

Los perfiles de RNA-seq se agruparon jerárquicamente de una manera no supervisada demostrando una clara segregación del grupo joven (n=4) versus el senil (n=4). El análisis estadístico del RNA-seq mostró que hay 210 genes diferencialmente expresados en el hipocampo entre los jóvenes y los seniles. Entre estos genes hay 81 que están sobre-expresados y 129 que se encuentran sub-expresados en las ratas seniles. El análisis ontológico de los genes mostró que aquellos desregulados pertenecen a la vía de la respuesta inmune, la adhesión celular por la vía mediada por integrinas y a la respuesta a corticoesteroides. (Pardo y col. 2017).

De esta manera, sabemos que la reactividad inmune y los procesos inflamatorios aumentan con el envejecimiento cerebral (Lucin y Wyss-Coray 2009), siendo la microglia protagonista en esta desregulación inmunitaria, como efector inmune de inflamación y de reconocimiento de antígenos en el cerebro (Streit y col. 2004; Ding y Chen 2010; Norden y Godbout 2013).

1.1.2 Envejecimiento cerebral

En Argentina, la población anciana se ha incrementado en las últimas décadas de una manera notable (Figura 1), reflejando lo que ocurre a nivel global.

ÍNDICE DE ENVEJECIMIENTO EN ARGENTINA

	1970	1980	1991	2001	2010
Total	57.0	62.7	65.1	61.7	55.6
Jóvenes	46.0	49.4	50.5	45.7	39.6
Mayores	11.0	13.3	14.6	16.0	15.9

Figura 1. Índice de envejecimiento en Argentina. Datos obtenidos de los censos del INDEC. Nótese cómo el índice ha aumentado un 50% en los últimos 40 años. Se calcula como el cociente entre la población de 65 años y más sobre la población de 0 a 14 años, multiplicado por cien.

En la actualidad, a lo largo de los años ha habido un aumento constante de la esperanza de vida de la población en todo el mundo que ha puesto en relieve los diversos problemas médicos y socioeconómicos de la población geriátrica. Esto ha llevado a un aumento en la investigación del envejecimiento tanto a nivel clínico como básico y, por ende, en el envejecimiento del cerebro que ha ocupado un lugar central en dichos estudios.

El envejecimiento cerebral no patológico se asocia con un deterioro cognitivo en humanos junto con alteraciones celulares y moleculares subyacentes que incluyen el daño oxidativo, deterioro mitocondrial, neuroinflamación, modificaciones en el metabolismo de la glucosa y neuroinflamación. Estos cambios progresan lentamente a lo largo de los años durante la vejez constituyendo lo que se denomina envejecimiento cerebral no patológico (Poddar y col. 2018). Finalmente produce como resultado un deterioro en la calidad de vida de las personas de edad, originando morbilidad y eventualmente la necesidad de atención institucional (Deary y col. 2009).

El envejecimiento es el fenómeno producido por el paso del tiempo en la vida de un ser vivo y es un evento que el hombre está motivado a vencer. La problemática del envejecimiento sobre la salud humana puede dividirse, arbitrariamente en dos aspectos:

- 1) El envejecimiento constituye un factor de riesgo para numerosas enfermedades. Un ejemplo de esto son las enfermedades neurodegenerativas más prevalentes, la enfermedad de Alzheimer (EA) y la enfermedad de Parkinson (EP). Estas patologías pueden desarrollarse a partir de una causa genética o esporádica, siendo la edad avanzada el principal factor de riesgo para la aparición esporádica.
- 2) El envejecimiento desencadena un progresivo deterioro de toda la región corporal.

Dicho fenómeno no se considera una patología sino una característica de la edad avanzada.

Además, el cerebro envejecido es el nicho clave para el desarrollo de patologías como la Enfermedad de Alzheimer (EA), que se presenta con una pérdida de la memoria y la cognición

junto con la pérdida neuronal difusa y los signos histopatológicos característicos (Serrano-Pozo y col. 2011).

Se sabe que el cerebro viejo que sufre enfermedades neurodegenerativas como en EA, EP y Enfermedad de Huntington (EH) presenta una disminución significativa del número de células, así como también su volumen, no sucede así en los cerebros viejos “sanos” (Gorman y col., 2008). Se reconoce claramente que la función del cerebro senil muestra deficiencias cuando se compara con su contraparte joven. Posiblemente, las causas de tal deficiencia se encuentren a nivel de los cambios en las conexiones neuronales y/o cambios a nivel molecular, ya sea por alteraciones de expresión génica o epigenética.

Para nuestros estudios sobre envejecimiento cerebral, es preciso contar con un modelo animal que nos permita llevar a cabo experimentos de ciencia básica. En nuestro laboratorio, históricamente hemos utilizado como modelo de envejecimiento a la rata hembra senil de la cepa Sprague Dawley (SD). De esta manera, nuestra colonia exocriada de ratas Sprague Dawley (SD) fue fundada en la década del '80, siendo la fuente original de animales el bioterio del laboratorio Bagó, quienes generosamente nos donaron los planteles iniciales. En nuestro bioterio, la rata hembra senil vive típicamente hasta los 34-36 meses de edad y su vida reproductiva cesa a los 9-10 meses (Rodríguez y col., 2013). El principal problema de salud que tienen estos animales al envejecer es el desarrollo de prolactinomas en su hipófisis, lo cual conlleva a niveles séricos elevados de prolactina y en consecuencia a la aparición de tumores mamarios (Hereñu y col., 2006).

1.1.3 Alteraciones cognitivas

El envejecimiento cerebral normal en humanos se asocia con un déficit cognitivo. En particular, se ven afectadas negativamente la adquisición y retención de nuevos aprendizajes espaciales (Rosenbaum y col., 2012). En ratas, se ha observado en el envejecimiento normal un deterioro significativo en la memoria de trabajo y de referencia espacial dependiente del hipocampo, evaluado mediante el laberinto acuático de Moris (MWM) (Gallagher, Burwell y Burchinal 1993; Vorhees y Williams 2006). También se ha demostrado que la memoria espacial a largo plazo está deteriorada en ratones envejecidos evaluando la tarea de memoria de ubicación de objetos, mientras que no se ve afectada de tal modo la memoria de reconocimiento de objetos (Wilmmer y col. 2012). Sin embargo, existen estudios que demostraron que los animales envejecidos responden de manera heterogénea al deterioro de la memoria y en tareas de aprendizaje, por lo cual, se ha propuesto que el déficit cognitivo relacionado con la edad progresa con la edad a diferentes velocidades en los distintos individuos. (Beas, Setlow y Bizon 2013). Las deficiencias relacionadas con la edad en la función cognitiva son cada vez más importantes en una población que envejece, debido no solo a afecciones como la enfermedad de Alzheimer y el deterioro cognitivo leve sino también el deterioro cognitivo “normal” con la edad. La evidencia psicométrica indica una disminución en el aprendizaje episódico y la memoria que es particularmente evidente en envejecimiento normal y predictivo de la enfermedad de Alzheimer más adelante en la vida. (Backman y col. 2001, Daselaar y col. 2003 a,b).

1.2 Enfermedad de Alzheimer

1.2.1 Generalidades

La enfermedad de Alzheimer (EA) fue descrita por primera vez en 1906 por el médico alemán Alois Alzheimer, tras el estudio del caso clínico de la paciente Auguste D. Los síntomas identificados por el Dr. Alzheimer fueron desorientación espacio temporal, pérdida de la memoria, delirios y finalmente la muerte (LaFerla y col., 2005).

La EA es la forma más común de demencia y contribuye al 60%-70% de los casos (World Alzheimer Report, 2018). Se define a la demencia como un síndrome caracterizado por la alteración de múltiples funciones cerebrales, que incluyen la memoria, el pensamiento, la orientación, la comprensión, el cálculo, la capacidad de aprendizaje, afasia (disminución progresiva de la capacidad del lenguaje) y el juicio (Demencia-OMS 2018). Es un proceso neurodegenerativo progresivo e irreversible caracterizado por no sólo lo antes mencionado sino también la desorientación espacio-temporal, cambios de humor, alteraciones conductuales, apraxia (alteración de los gestos e incapacidad de realizar tareas rutinarias) agnosia (incapacidad de reconocimiento de personas o cosas) (Reiman y Castelli 1999; van Strien, Cappaert y Witter 2009). Estas alteraciones se deben a daños selectivos en regiones cerebrales implicadas en dichos procesos, tales como el hipocampo, la corteza entorrinal, la amígdala y el telencéfalo basal. El curso clínico de la EA suele durar unos 10 años y, normalmente la muerte sobreviene por complicaciones secundarias a la enfermedad y al debilitamiento que conlleva, como neumonía, embolia pulmonar o sepsis (Reiman y Caselli 1999).

Han sido descritas dos formas de EA, la familiar (EAF) y la esporádica (EAe). La EAF corresponde a menos del 5% del total de casos de EA y se caracteriza por un inicio precoz de aparición de los síntomas, entre los 30 y los 60 años aproximadamente. Se sabe que menos del 5% de los casos de EA son causados por mutaciones missense (con pérdida de sentido) en el gen de la proteína precursora amiloide (APP), de las presenilinas 1 o 2, ubicados en los cromosomas 21, 14 y 1, respectivamente, con un patrón de herencia autosómico dominante. La proteína APP, cuyo rol no está bien definido, es la precursora de los péptidos β -amiloides ($A\beta$) y resulta clivada por un grupo de enzimas proteasas, entre ellas las presenilinas. (Lynn M. Bekris, y col. 2010).

No obstante, más del 95% de los casos de (EA) son esporádicos y se caracterizan por un inicio tardío de la aparición de los síntomas, a partir de los 65 años. No se conoce aún la causa exacta de la EA esporádico (EAe), pero se han identificado diferentes factores de riesgo como mutaciones en el gen de la apolipoproteína E4 (Lynn M. Bekris, y col. 2010), factores ambientales, traumatismos y, principalmente, el envejecimiento. Es esencial destacar que la EA no es una consecuencia normal del envejecimiento, pero este es el principal factor de riesgo para esta forma de enfermedad.

1.2.2 Alteraciones en la Enfermedad de Alzheimer

A nivel macroscópico, la patología incluye la atrofia cerebral la cual aparece prácticamente siempre en las fases clínicas de esta enfermedad y afecta preferentemente a la corteza cerebral, sobre todo en las áreas temporo-parietales, al hipocampo y a la amígdala (Walsh and Selkoe, 2004b). El grado de atrofia cerebral se relaciona con el progreso de la enfermedad. (Figura 2)

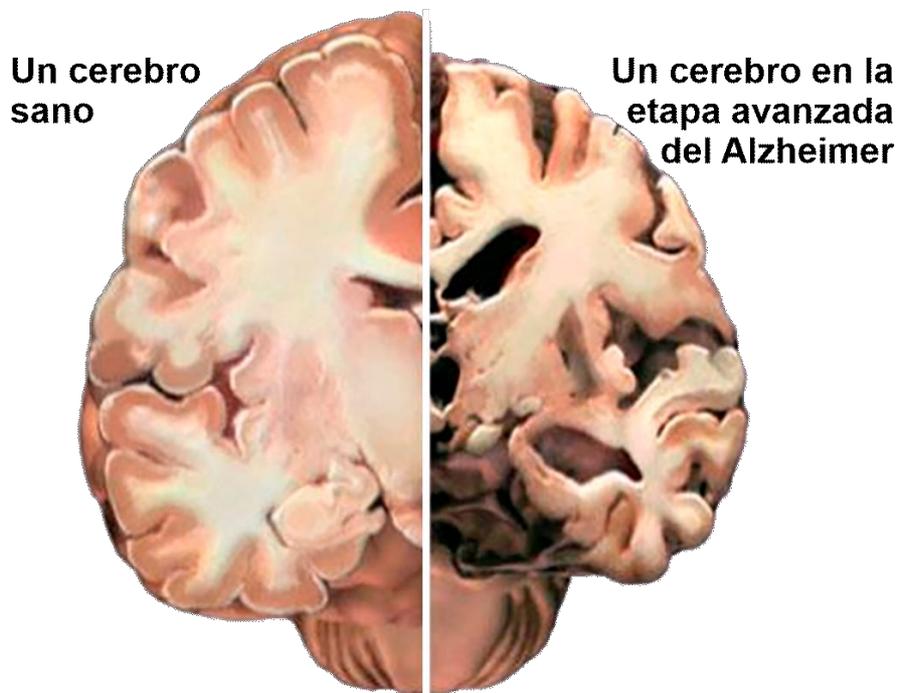


Figura 2. Imagen comparando los hemisferios cerebrales de un individuo sano (izquierda) y un paciente con la enfermedad de Alzheimer. Se aprecia cómo el cerebro con Alzheimer posee un menor volumen, un adelgazamiento severo de la corteza, una dilatación ventricular pronunciada y una reducción significativa del hipocampo. (Bird 2008)

Durante décadas se propuso que la EA se ve causada por una acumulación anormal de proteínas que conforman, placas seniles o neuríticas extracelulares y ovillos neurofibrilares intracelulares. Dichos agregados conllevan a estrés oxidativo, neuroinflamación, pérdida y degeneración neuronal (especialmente en el hipocampo y la corteza) y el incorrecto funcionamiento de la sinapsis (LaFerla FM, 2005) (Querfurth HW, 2011).

También pueden aparecer en el cerebro de los pacientes con EA otras lesiones no específicas, entre ellas, degeneración granulovacuolar, los cuerpos de Hirano y los cuerpos de Lewy (López and DeKosky, 2003). Todo esto conlleva a la interrupción de las principales vías aferentes y eferentes del hipocampo, lo que explica, en parte, el déficit cognitivo observado en esta enfermedad (Bigl and Schliebs 1998; Selkoe 1999).

Si bien hay evidencia tangible respecto a la acumulación de proteínas mal plegadas en los cerebros de Alzheimer, en la actualidad el hecho de que esta sea la causa principal de la enfermedad está puesto en duda. Cabe destacar que el metabolismo de la glucosa y la vía de señalización de la insulina se encuentran alterados en un cerebro afectado con la patología, con lo cual recientemente se ha sugerido que la EA es una enfermedad metabólica. (Frolich L, 1998); (Hoyer S. 2004).

Placas neuríticas

Los péptidos β son productos normales del metabolismo del cerebro, originados por el clivaje proteolítico de un grupo de enzimas que actúan secuencialmente. Sin embargo, en la EA un desbalance entre el clivaje y la síntesis proteolítica lleva a su acumulación anormal y a la formación de placas neuríticas o amiloides extracelulares, por el depósito de una proteína denominada beta-amiloide. (Lichtenthaler SF, 2011). Dicha agregación ejerce efectos negativos sobre la homeostasis neuronal: Promueven la apoptosis, provocan daño oxidativo, fomentan la hiperfosforilación de la proteína tau, tienen efectos tóxicos en las sinapsis y mitocondrias, y también promueven la inflamación local, desencadenando microgliosis y astrogliosis. (Bruce A. 1991); (Kurz A, 2011).

Si bien la hipótesis amiloide establece que la acumulación del péptido $A\beta$ es el evento primario de la EA, desencadenando los cambios neurodegenerativos de la patología $A\beta$, en la actualidad se sabe que esta hipótesis no puede explicar de manera completa la fisiopatología de la enfermedad, y es seriamente cuestionada para los casos de EA. (Hardy J, 2002) (Salkovic-Petrisic M., 2008). (Figura 3)

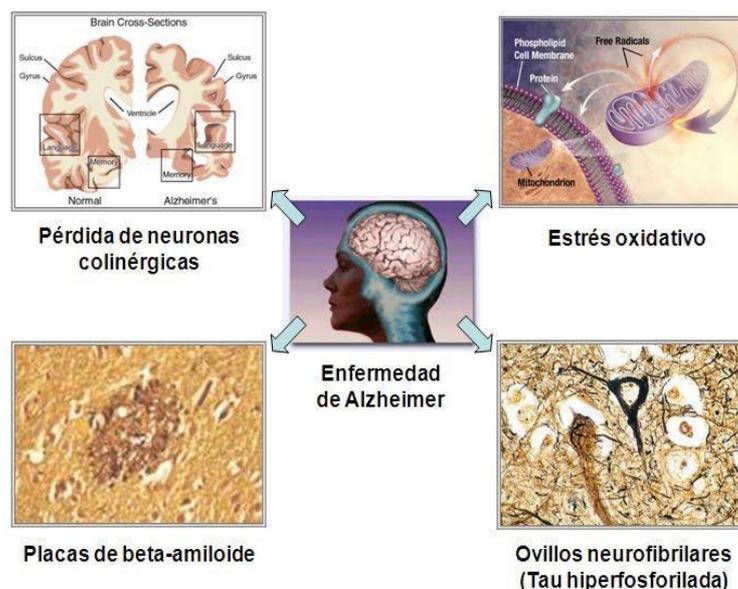


Figura 3. Alteraciones en el cerebro debido a la enfermedad de Alzheimer. Microscópicamente, las principales características neuropatológicas de la enfermedad consisten en depósitos anormales de proteínas (Goedert y Spillantini 2006), que conforman ovillos neurofibrilares de la proteína Tau agregada y placas seniles del péptido β -amiloide (Gómez-Isla y col. 2008, Perl 2010). También se observa una reducción y pérdida de los marcadores corticales de actividad colinérgica; dichos agregados conllevan a una descompensación entre la producción de los radicales libres y la defensa antioxidante celular, que conduce a fallos en diferentes funciones biológicas. oxidación de lípidos, proteínas y ADN y finalmente a la muerte celular.

Ovillos neurofibrilares

La proteína tau, normalmente soluble en axones, promueve el ensamblaje y la estabilidad de los microtúbulos y las vesículas de transporte. Su actividad depende del estado de la

fosforilación en la que se encuentre, por lo que la célula lleva a cabo una fina regulación de su fosforilación y desfosforilación, según las necesidades fisiológicas. La forma hiperfosforilada de tau pierde afinidad por los microtúbulos, y si se encuentra en cantidades excesivas para la célula, no sólo provoca el desacoplamiento de microtúbulos, sino que además la proteína se auto-ensambla formando ovillos neurofibrilares intracelulares. En la EA, tau hiperfosforilada se encuentra notablemente aumentada, atribuido a un desbalance de las actividades de enzimas quinasas y fosfatasas. (Kumar A, 2015) (Wang JZ, y col., 2013). (Figura 4)

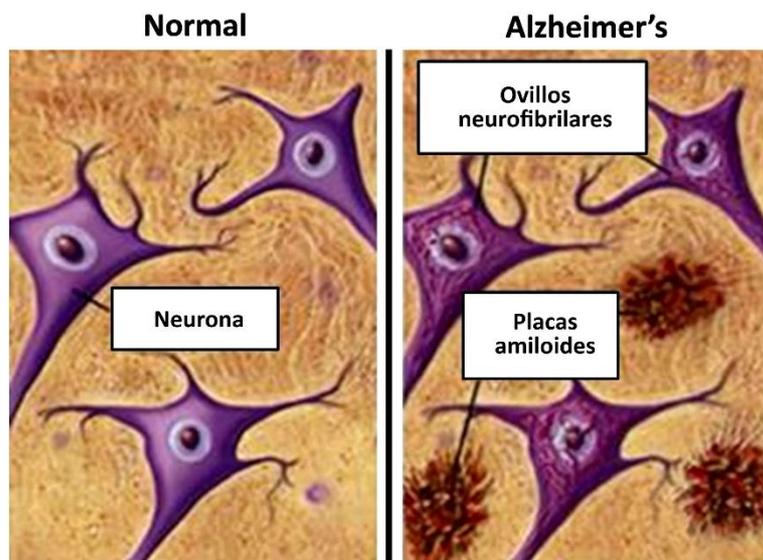


Figura 4. La enfermedad de Alzheimer se considera también una taupatía, debido a la agregación anormal de la proteína tau. Las neuronas sanas están compuestas por citoesqueleto, una estructura intracelular de soporte, parcialmente hechas de microtúbulos. Estos microtúbulos actúan como rieles que guían los nutrientes y otras moléculas desde el cuerpo hasta los extremos de los axones y viceversa. Cada proteína tau estabiliza los microtúbulos cuando es fosforilado y por esa asociación se le denomina proteína asociada al microtúbulo. En la EA, la tau procede por cambios químicos que resultan en su hiperfosforilación, se une con otras hebras tau creando ovillos de neurofibrillas y, de esta manera, desintegra el sistema de transporte de la neurona. Editado de www.alzheimertierradebarros.es

1.2.3 Aprendizaje y memoria

Definición de aprendizaje

El aprendizaje es el proceso mediante el cual adquirimos conocimiento sobre el mundo. Este está relacionado de forma independiente con el proceso de la memoria, sin embargo, son las dos caras de la misma moneda. Es decir, para que el aprendizaje sea llevado a cabo en un momento determinado, éste tuvo que haber sido almacenado previamente.

La cognición es un término general que se aplica a procesos como el aprendizaje, la memoria, la asociación, el lenguaje, la atención, la formación de conceptos y la resolución de problemas. Cuando uno de estos procesos falla en un individuo, decimos que éste presenta un déficit cognitivo (Morgado Bernal I. 2015; Kandel y col., 2000).

El aprendizaje se divide frecuentemente en dos tipos, *Asociativo* y *no Asociativo*.

En este contexto, a principios del siglo XX el aprendizaje y la memoria fue estudiado en el laboratorio por un fisiólogo ruso Ivan Pavlov, quien demostró que era posible enseñar a los perros a asociar el sonido de una campana o de un rayo de luz con la inminente llegada de comida (*Asociativo con condicionamiento clásico*) (Morgado Bernal I. 2015; C. A. Barnes. 1979).

Hacia los años treinta, un psicólogo estadounidense Burrhus Frederic Skinner expuso otra forma de aprendizaje cuando demostró que se podía enseñar a las ratas a apretar una palanca o recorrer un complejo laberinto para obtener comida (*Asociativo con condicionamiento instrumental*) (C.A. Barnes 1979).

Por otra parte, el aprendizaje *no asociativo* es el más primitivo, que es vital para la supervivencia de cualquier especie, se subdivide en dos tipos: la **habituación** y la **sensibilización**.

En cuanto a la *habituación*, se refiere al proceso por el cual ante un estímulo repetido, la respuesta es cada vez menos intensa. Un ejemplo típico se da cuando se trabaja en un ambiente ruidoso: La habituación al ruido produce que este se perciba como menos intenso de lo que es. El proceso opuesto a la habituación es la *sensibilización*, que consiste en el aumento de la respuesta ante un estímulo (debido a que sea nuevo o a que sea perjudicial). (C.A. Barnes 1979), (Morgado Bernal y col., 2015; Tulving y col., 1972).

1.3 Definición y Clasificación de la memoria

La memoria es la capacidad mental que posibilita a un sujeto registrar, conservar y evocar las experiencias, consiste en múltiples mecanismos especializados en codificar, almacenar y recuperar información acerca de rutas, configuraciones y localizaciones espaciales. Se considera que las principales regiones involucradas en los procesos de la memoria son los lóbulos frontales y temporales, el tálamo, la circunvolución del cíngulo, los ganglios basales, el hipocampo, la amígdala, los cuerpos mamilares del hipotálamo, los núcleos anterior y mediodorsal del tálamo, los núcleos del septo y la corteza entorrinal (Kessels, de Haan, Kappelle, y col., 2001a).

La memoria se puede agrupar de acuerdo con su duración, en *memoria de corto y de largo plazo*. La primera, también llamada memoria de trabajo, tiene lugar en el orden de segundos o minutos y funciona a nivel celular con las macromoléculas presentes en un momento dado. Por el contrario, la memoria de largo plazo es un proceso que requiere de la síntesis de proteínas y se manifiesta en el orden de horas, días o años (Kandel y col., 2000).

La memoria a corto plazo es una memoria frágil y transitoria que enseguida se desvanece y que resulta muy vulnerable a cualquier tipo de interferencias. Se basa en la actividad o cambios efímeros, eléctricos o moleculares, en las redes neuronales que procesan la información. Si como consecuencia de la repetición de la experiencia los cambios neurales de la memoria a corto plazo persisten, pueden activar otros mecanismos de plasticidad cerebral produciendo cambios estructurales en las sinapsis, es decir, en las conexiones entre las neuronas. Estos cambios constituyen el soporte físico del siguiente estadio, denominado memoria a largo plazo

y este proceso se denomina consolidación de la memoria. (Kandel E. R. y col., 2001; Malenka R. C. y col., 2004).

Un individuo siempre adquiere nuevas memorias a través de la memoria a corto plazo, esta nueva información puede ser borrada o almacenada en el tiempo. Para que esto último ocurra la información se debe traspasar al sistema de almacenamiento a largo plazo.

Una vez que la memoria es recuperada, es reactivada y puede ser modificada. En la ventana temporal en la cual una memoria es recuperada, es susceptible a interferencias o al olvido mientras es almacenada a largo plazo. Siendo el olvido el proceso en el cual se pierde la capacidad de activar información previamente aprendida, simplemente porque esa información ha sido eliminada, por ejemplo, cuando hay muerte de neuronas a causa de una enfermedad neurológica. (Tarpy y col., 2000).

Algunos científicos plantean la hipótesis de que la información sigue presente en las neuronas, no obstante, esa información no puede ser recuperada debido a la acción de mecanismos inhibitorios.

Otras de las clasificaciones más utilizadas dividen a las memorias en dos categorías basadas en la accesibilidad a la consciencia: *Memorias declarativas o explícitas* a aquellas a las que podemos referirnos describiéndolas o por el acto de recordar la experiencia, mientras que el resto pertenece a la categoría de *memorias implícitas o no declarativas*. Este recuerdo consciente permite utilizar estas experiencias previas para nuestras acciones presentes o para pensar el futuro basándonos en experiencias previas y conocimiento. (Eichenbaum, y col., 2003; Squire, y col., 2011).

Las **memorias declarativas** suelen dividirse en memorias *semánticas o episódicas* (Squire, y col., 2011; Tulving y col., 2002). La *memoria semántica* refiere al registro estructurado y general de los hechos, significados, conceptos y conocimiento del mundo externo.

Por otra parte, la *memoria episódica* es la memoria de eventos autobiográficos específicos y únicos, que incluye al conjunto de objetos o personas asociados a la experiencia y el contexto tanto espacial como emocional. La memoria episódica nos permite revivir mentalmente experiencias pasadas con gran detalle, y se asume que esto se logra a través de la reinstalación de esas representaciones neuronales en el cerebro en forma de representaciones internas (Tulving y col., 1972; Nyberg y col., 2010).

En un mundo cambiante, los eventos suelen darse sólo una vez, por lo cual la memoria episódica requiere de un aprendizaje rápido (Tulving y col., 2002).

Memoria operativa o de trabajo (working memory): capacidad de recordar durante un periodo de tiempo breve. Información que debe distinguirse de información similar aprendida previamente.

Memoria latente (latent memory): Es la adquisición de información neutral que no influencia inmediatamente el comportamiento.

Memoria de referencia (reference memory): Contiene la información reciente y remota obtenida por experiencias previas que se mantiene constante a lo largo del tiempo.

En roedores, es posible estudiar los mecanismos neurobiológicos que subyacen a la formación de memorias de tipo episódicas usando métodos que no son posibles en la investigación en humanos, y este tipo de memorias pueden ser modeladas en roedores utilizando una variedad de paradigmas (Pause y col., 2013), entre ellos se puede evaluar la memoria espacial y la memoria de reconocimiento de objetos.

El reconocimiento deriva de dos componentes: la familiaridad y el recuerdo (*recollection*, del inglés), de acuerdo con la teoría del “modelo dual de procesamiento” (Eichenbaum y col., 2007; Diana, R.A, y col., 2007; Mayes, A. y col., 2007). El recuerdo activa memorias de detalles contextuales específicos de un evento o episodio particular. El contexto espacial suele ser una parte importante de una memoria episódica, y puede ser en parte el motivo de que se asocien las memorias episódicas al funcionamiento del sistema hipocampal.

1.3.1 Fases de la memoria

Las memorias no se generan en su forma definitiva, sino que se dan como parte de un proceso en el cual memorias originalmente vulnerables pueden fortalecerse y volverse resistentes y duraderas. El proceso de formación de una memoria estable luego del aprendizaje, durante el cual la memoria es susceptible a interferencias, se denominó “consolidación” (Dudai Y. y col., 2004).

La memoria puede ser dividida en al menos tres etapas: *adquisición*, *consolidación* y *evocación* (Figura 5) (Tarpy y col., 2000).

La *adquisición* o fase de aprendizaje ocurre cuando el individuo aprende la relación entre diversos estímulos, adquiere habilidades o destrezas necesarias para responder adecuadamente a diferentes estímulos.

La *consolidación* se define como el proceso por el cual la memoria recién adquirida se hace estable y duradera en un intervalo temporal específico.

La *recuperación* es la activación de la información previamente almacenada, lo que normalmente llamamos “evocación”.

La consolidación de la memoria parece producirse por un proceso de LTP (long term potentiation: Potenciación a largo plazo) en las terminales de la vía perforante en el DG y en las sinapsis de neuronas piramidales de CA3 con neuronas de CA1 (vía colateral de Schaffer). Evidencias tanto experimentales como de pacientes con daños en la formación del hipocampo indican que esta región está implicada en la formación y consolidación de memoria declarativa (Zola-Morgan, y col. 1994; Mishkin y col. 1997). Esa información se transfiere después a la neocorteza, donde es almacenada.

La región hipocampal en humanos parece ser crucial para la memoria declarativa independientemente de la modalidad sensorial, y no puede recordarse ni expresarse explícitamente cuando esta región ha sufrido algún daño (Victor & Agamanolis, 1990).

Existe evidencia neuroanatómica y neurofisiológica que muestra como el hipocampo integra múltiples tareas corticales relevantes para la percepción y la memoria, e interviene en la

codificación de las asociaciones entre las características espaciales y temporales de los estímulos ambientales (Kessels, de Haan, Kappelle, and Postma 2001b).

Hoy se sabe que el hipocampo, especialmente las áreas CA1 y CA3, en roedores, participan en la denominada “memoria espacial”. O’Keefe (1978) y Muller (1996) demostraron la existencia de células piramidales hipocámpicas, denominadas “células de lugar”, las cuales se cree que dan información del lugar específico donde se encuentra el animal. Experimentos posteriores han determinado que estas células se activan cuando la cabeza del animal está orientada en determinada posición (Frielingsdorf, Thal, and Pizzo 2006). En 1978, O’Keefe y Nadel propusieron que el hipocampo pudiera ser la estructura cerebral a través de la cual se forma el mapa cognitivo que permite al animal navegar en el espacio (O’Keefe and Conway 1978). El hipocampo contendría un mapa cognitivo formado por células de lugar con el que el animal podría moverse en su entorno. Estas células son algunas neuronas piramidales de las regiones CA1 y CA3 que disparan correlativamente a la posición del animal en el entorno, y se hallan activas durante la exploración y la localización de lugares (Weiner and Paty 1989).

Aunque la formación hipocámpica es central para el aprendizaje espacial, el mecanismo neurobiológico subyacente a este aprendizaje podría implicar la acción coordinada con otras regiones cerebrales. Se ha observado que animales con lesiones en el hipocampo pueden llegar a desarrollar aprendizaje espacial, lo que hace pensar que hay otras estructuras implicadas en este aprendizaje (Ramos y col., 2003).

A partir del estudio mediante lesiones controladas, la inactivación farmacológica y el uso de knock outs restringidos al HP (hipocampo) se pudo demostrar el rol del HP en el aprendizaje de memorias espaciales (Tang, Y. P y col., 1999; Pastalkova, E. y col 2006), especialmente las áreas CA1 y CA3, en roedores (Muller, 1996). Estudios de imágenes en animales, así como RMF (Resonancia Magnética Funcional que es una técnica de neuroimagen capaz de detectar los cambios fisiológicos ocurridos en el cerebro relacionados con procesos mentales) en humanos apoyan el rol de la actividad hipocámpica en las memorias de tipo episódicas (Yonelinas, A. P. y col., 2002; Goshen, I. y col. 2011). El HP está involucrado en el aprendizaje asociativo únicamente cuando el estímulo debe asociarse con una posición, pero no si la ubicación espacial no es un componente de la tarea, indicando el requerimiento de un componente espacio-temporal en la tarea para su reclutamiento (Gilbert, P. E. y col., 2002; Kesner, R. P. y col., 2015;). Estudios neuroanatómicos y electrofisiológicos confirman que el hipocampo de las ratas viejas tiene pérdida de sinapsis en el giro dentado, también hay pérdida de sinapsis funcionales en el área CA1 y una disminución de la respuesta receptora NMDA (de N-metil-D-aspartato) en la sinapsis de la vía perforante en las células granulares del GD. Estas alteraciones pueden perjudicar la plasticidad sináptica del HP, lo que podría ser una de las causas del deterioro espacial observado en el envejecimiento (Shapiro 2001).

Estudios realizados en nuestro laboratorio, en ratas hembra Sprague-Dawley, empleando un test de memoria espacial, el laberinto de Barnes, demostraron que los animales seniles (30 meses de edad) presentaron un importante déficit cognitivo al compararlos con los animales jóvenes (6 meses de edad) (Morel, 2011). En estos animales evaluamos solamente la región CA1 del HP, es por ello por lo que en esta tesis decidimos enfocarnos en estudiar mediante

morfometría el área CA3 del HP, en todos los grupos etarios, explicado posteriormente en la segunda parte de este trabajo.

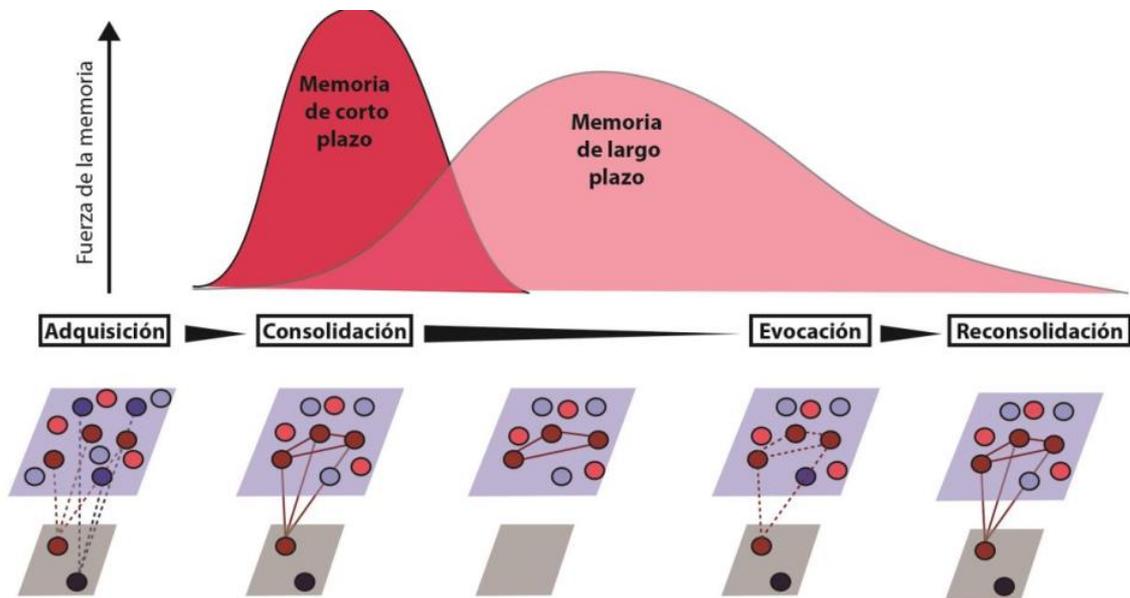


Figura 5: Fases de la memoria. (Panel superior). Disección de las fases de la memoria. La formación de una nueva memoria involucra etapas de corto y largo plazo que no están asociadas secuencialmente sino que son independientes, se dan en paralelo y son diferenciables tanto mecánicamente como anatómica y temporalmente. (Panel inferior) Esquemas ilustrando la conectividad sináptica en ensambles neuronales reclutados durante la formación de una nueva memoria, y cómo cambios en la fuerza de conexiones sinápticas actúan como posibles sustratos del almacenamiento en la memoria. Antes del evento, las neuronas presentan un patrón de conexiones, y un número dado de neuronas se va a activar frente a un evento. Dentro de estas neuronas activas durante la codificación de una memoria, algunas van a ser reclutadas para formar parte del engrama mnemónico (rojas), mientras que otras sólo para codificar información incidental (azul). Inmediatamente después de la codificación, la consolidación de la memoria permite estabilizar las nuevas conexiones. La estabilización involucra un aumento en la fuerza sináptica en forma sinapsis-específica que es fundamental para que luego pueda darse una correcta evocación, y que puede ser alterado si se afecta la síntesis de proteínas necesarias para estos cambios plásticos. Luego de la evocación, las memorias pueden reactivarse y al desestabilizarse estas nuevamente se vuelven vulnerables, siendo necesario que pasen por una nueva etapa dependiente de la síntesis de proteínas (reconsolidación) para re-estabilizarse. Adaptado de Miranda, M (2019)

1.3.2 Memoria espacial en ratas

Los roedores hacen uso del aprendizaje y memoria espacial en su vida silvestre, por ejemplo, para buscar alimento. En el laboratorio sacamos ventaja de este comportamiento natural para evaluar capacidades mnemónicas (la capacidad psíquica que permite almacenar y recordar aquello que ya pasó). Una de nuestras herramientas para esto es el uso de laberintos, en donde los roedores deben poner en juego su capacidad cognitiva para orientarse en el espacio para determinado fin, sea recompensarse con un alimento o escapar de un ambiente nocivo. Dentro del lóbulo temporal medial, el sistema de estructuras importantes para la memoria espacial incluye el hipocampo y las cortezas parahipocámpal, entorrinal y perirrinal. El hipocampo que

consta del HP propiamente dicho (cornu Ammonis; CA1 -CA2-CA3 CA4) y el giro dentado (DG), es un componente clave y central de la red de memoria espacial (Kesner y Hopkins, 2006).

1.3.3 Memoria de separación de patrones en roedores

El concepto de separación de patrones se ha derivado de las teorías computacionales de redes neuronales relativas a la función del hipocampo. Lo que se sabe es que el hipocampo, y especialmente el giro dentado (DG), está muy involucrado en la separación de patrones (Morris AM y col., 2009). La corteza entorinal (CE) es la principal fuente de entrada al hipocampo, a través de sus conexiones con el DG. Del DG, la información se envía a la región CA3 y desde allí se envía a CA1. A su vez, esta última se proyecta al subículo y envía la salida del hipocampo de regreso a la CE (Myers CE y col., 2011).

La separación puede ser uno de los síntomas cognitivos de múltiples trastornos neurológicos y psiquiátricos.

Se sabe que el HP, produce la "separación de patrones", en la que dos señales de entrada similares se transforman en señales disímiles para reducir la interferencia entre ellas cuando se almacenan en la memoria, y el "rellenado de patrones", que permite el uso de indicios parciales para recuperar señales almacenadas, así cuando vemos por ejemplo sólo una parte de una figura conocida podemos traer a nuestra mente la forma de la figura completa. (Figura 6). Diversos estudios han demostrado que los roedores que padecen de lesiones en DG dorsal fueron menos capaces de discriminar entre objetos muy cercanos unos de otros, que entre objetos que fueron espacialmente más separados (Morris AM y col., 2012; Goodrich-Hunsaker y col., 2008; Kesner RP y col., 2007). La separación de patrones se logra a través de la dispersión de la entrada de la CE en las células granulares del DG, que tienen pequeños campos. Estos a su vez, escasamente envían la información a las células piramidales CA3 a través de las sinapsis de fibras musgosas (Clelland C, y col., 2009; Kheirbek MA y col., 2012). Posteriormente, entradas similares o interferentes se pueden procesar por separado. La evidencia para apoyar estas teorías computacionales proviene de estudios electrofisiológicos y de lesiones realizados en roedores. En estudios de roedores con lesiones en el DG dorsal se sometieron a un test de separación espacial denominado tabla de quesos, se ha demostrado que esta parte del hipocampo es particularmente sensible a manipulaciones de estímulos en distancias espaciales reducidas. Los roedores que padecen de lesiones en DG dorsal fueron menos capaces de discriminar entre objetos muy cercanos unos de otros, que entre objetos que fueron espacialmente más alejados (Morris AM, y col., 2012; Goodrich-Hunsaker NJ y col., 2007; Kesner RP, y col., 2007; Gilbert PE y col., 2005). Se realizó la misma tarea con ratas lesionadas en CA3 y se descubrió que estas ratas se vieron afectadas por igual en separaciones espaciales, tanto cercanas como alejadas. Esto muestra que la región hipocámpal CA3 es importante para la memoria espacial en su conjunto, mientras que el DG es específico para los procesos de separación de patrones (Gold AE y col., 2005).

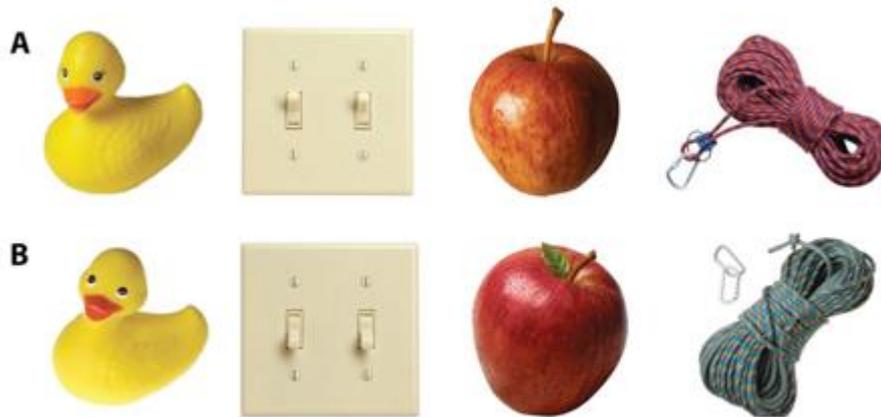


Figura 6: La memoria puede distinguir objetos con características similares. En esta figura se muestran pares de objetos con una versión ligeramente diferente de tal objeto. (Bakker A. 2008)

1.4. El Hipocampo de la rata

1.4.1 Anatomía, función y modificación en el envejecimiento

El HP forma parte del sistema límbico, presenta una gran plasticidad estructural y funcional, y está implicado en muchos procesos neurales, en particular, el aprendizaje y la memoria (Squire y col, 2004). Se encuentra localizado en la parte medial o interna del lóbulo temporal y fue denominado así por la gran semejanza a la forma del caballito de mar que se encuentra en el corte coronal típico de los primates, siendo en otros mamíferos de formas variadas (Figura 7).

De la misma manera que sucede en otros circuitos corticales, la red del HP es altamente dinámica y tiene la capacidad de modificar su conectividad cambiando el número y la fuerza de los contactos sinápticos dependiendo de su actividad (Bischofberger y col 2008); (Schinder y col., 2004). Las conexiones sinápticas se pueden añadir, reforzar, debilitar o eliminar en respuesta a la actividad neuronal, un fenómeno llamado plasticidad sináptica. La plasticidad de las sinapsis hipocampales específicas tiene un papel significativo en la formación de la memoria y el aprendizaje de tareas pendientes del hipocampo (Nakazawa y col., 2004; Witlock y col., 2006).

La forma larga y curvada del HP está presente en todos los órdenes de mamíferos, pero su estructura interna y el posicionamiento dentro del cerebro difiere entre roedores y humanos debido a variaciones en la migración del hipocampo durante el desarrollo embrológico. El HP del roedor, por ejemplo, está en una posición dorsal, y la relación de CA1 a CA3 es, por tanto, lo contrario de lo que se encuentra en los seres humanos (Duvernoy y col., 2013; Kier y col., 1997; (Figura 7 y 8). En la rata, el hipocampo se caracteriza por una estructura simétrica hacia ambos hemisferios cerebrales y en ella se pueden distinguir las siguientes dos zonas principales: El Giro dentado (DG) y el cuerno de Amon (CA) o hipocampo propiamente dicho. En este último, a su vez, se distinguen cuatro regiones denominadas CA1, CA2, CA3 y CA4 y

el subículo (Sb). (Figura 7c). (Amaral y Lavenex, 2006).

Por debajo de la capa de células piramidales de CA1 y CA2 se encuentra el Stratum Radiatum (SR). En cuanto al GD, este se encuentra formado por tres capas celulares: La capa molecular, la capa de células granulares y el Dentate hilus (DH). En dicha región, a lo largo de la vida, se forman nuevas neuronas por un complejo proceso denominado neurogénesis (Amaral, D. 2006) (Figura 7). El hipocampo humano está involucrado en una rotación compleja durante el desarrollo, lo que la deja en posición ventral, con CA1 en la región inferior y CA3 en la región superior (dentro el plano coronal). En la mayoría de los mamíferos, el hipocampo está involucrado en sólo rotación hemisférica parcial durante el desarrollo.

A pesar de las diferencias en la organización, el hipocampo es igualmente importante para la memoria espacial en ambas especies (Hartley y col., 2014), y se encuentra en estrecha comunicación con diversas regiones de la corteza cerebral en lo que podría considerarse un sistema, sistema hipocampal, en el cual incluye a las cortezas parahipocampal, entorrinal y perirrinal, las cuales serán detalladas más adelante en dicha tesis, están muy conservadas a través de cerebros de humanos, monos y roedores (Clark y Squire, 2013).

El cerebro con EA se caracteriza por pérdida de neuronas y cambios en la morfología neuronal. Esto refleja en atrofia y decrecimiento del peso cerebral. Precisamente, se ha evidenciado que el SR de CA1 y el DH del DG son dos zonas particularmente vulnerables a la degeneración en pacientes con EA. (West MJ. 1993); (Hyman BT, 1984).

Por otra parte, en modelos experimentales de la EA realizados en ratas, se ha observado que el hipocampo, junto con ciertas regiones de la corteza, también se ve afectado, no sólo por neurodegeneración, sino también por alteraciones de marcadores biológicos como los son la colina acetiltransferasa, S100 β y GFAP (*proteína gliofibrilar ácida*), los dos últimos, marcadores de astrocitos. (Obakh M, 2011); (Prickaerts J., 1999).

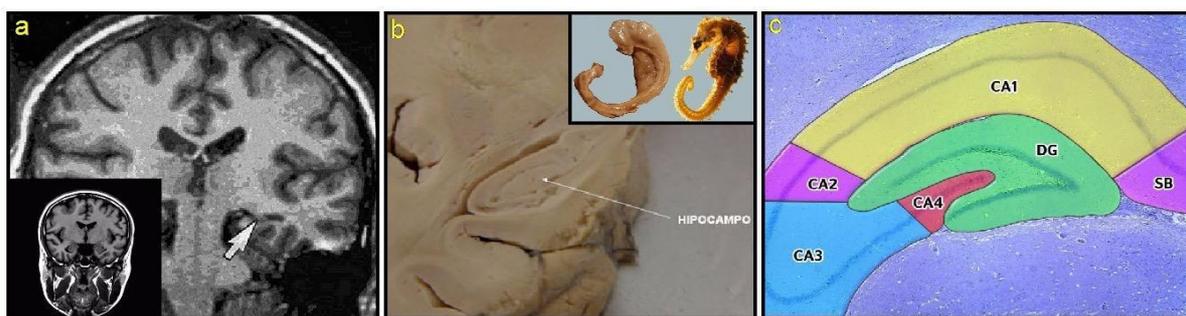


Figura 7. Hipocampo en el cerebro humano. a) Resonancia magnética cerebral, corte coronal T1 donde la flecha indica atrofia hipocampal. b) Corte cerebral humano, donde la flecha indica la zona del hipocampo. En el inserto se ve la similitud de la estructura del hipocampo humano (izquierda) y del caballito de mar (derecha).c) Se puede ver las tres áreas de la formación hipocampal el giro dentado (DG), el subículo (SB) y el Cuerno de Amón (CA), el cual, a su vez, se subdivide en cuatro zonas CA1, CA2, CA3 y CA4).

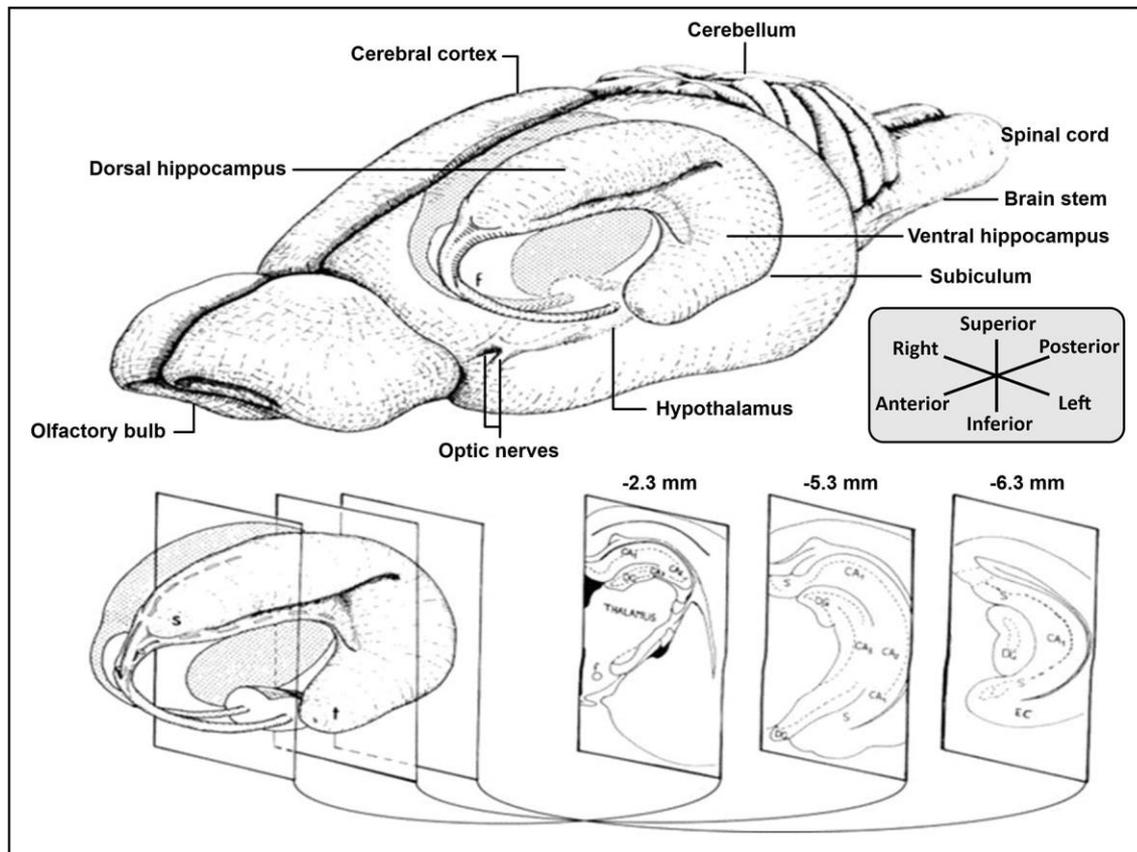


Figura 8. Diagrama del cerebro e hipocampo de la rata. En el panel A se observa la organización tridimensional del hipocampo de la rata. En el panel B se representan tres cortes coronales del hipocampo a distinta distancia del Bregma (anteroposterior) (AP): -2,3 mm, -5,3 mm, -6,3 mm). Imagen extraída de Cheung TH y col 2005.

1.4.2 Neurogénesis

La neurogénesis es un proceso complejo de producción de neuronas que es característico de los estados iniciales de neurodesarrollo y que incluye las fases de proliferación de las células pluripotenciales, la migración, la diferenciación, la supervivencia de las neuronas nuevas existentes y maduración e integración funcional en circuitos neuronales (Ming & Song, 2005; Kemperman y col. 2004), en el cual una proporción de las células recién generadas mueren después de la etapa de proliferación, siendo los puntos críticos del proceso, la supervivencia y la integración funcional.

Se consideró por muchos años que esta neurogénesis finaliza cuando los organismos se habían formado por completo. Sin embargo, en los años sesenta una serie de artículos publicados por Altman (Altman & Das, 1965, 1966) mostraron que en el cerebro de ratas adultas se producían nuevas neuronas en diferentes áreas (Lledo, y col, 2006; Ming & Song, 2005). A la fecha se tiene un reporte consistente de la producción de nuevas neuronas posteriores al nacimiento en diferentes especies, entre las que se encuentran peces (P. P. Amaral y col., 2009), aves (Louissaint Jr., y col, 2002), roedores (Tronel y col., 2010; Uda, y col 2006), primates (E Gould, y col., 2001) y humanos (Déry y col., 2013; Eriksson y col., 1998). Este proceso de proliferación, diferenciación e integración en circuitos establecidos de nuevas neuronas

(denominado neurogénesis adulta –NA–), se mantiene a lo largo de la vida de los mamíferos y las neuronas llegan a ser funcionales (Aimone, y col, 2011; Clelland y col., 2009a; Frankland & Josselyn, 2013; Hötting & Röder, 2013; Ming & Song, 2005; Pereira y col., 2007a).

Se ha constatado que en el cerebro adulto persisten poblaciones de células madre o precursores neurales con capacidad para proliferar y generar neuronas y células gliales. La neurogénesis ocurre de forma constitutiva en dos regiones específicas del cerebro adulto: La *zona subventricular de los ventrículos laterales* y la *zona subgranular del giro dentado* en el hipocampo. (Figura 9)

Las células hipocampales generadas de nuevo están implicadas en los procesos de aprendizaje y memoria (Shors y col., 2002) y se ha sugerido que la neurogénesis hipocampal incrementa la capacidad de aprendizaje de la nueva información y, por otro lado, también permite que se olvide información “vieja” o en desuso (Chambers y col., 2004).

La plasticidad neuronal se refiere a la capacidad del encéfalo para cambiar su estructura y su función durante el proceso de maduración y aprendizaje, y también frente al daño neuronal que se produce en las enfermedades. Este concepto implica que el cerebro es un órgano plástico que responde a diversos factores internos y externos que intervienen en la modulación y regulación de la neurogénesis tanto de forma positiva como negativa. Entre los factores positivos se puede citar son el ejercicio físico (van Praag and Kempermann y col., 2004), la insulina, los factores de crecimiento y algunas situaciones patológicas como traumas, epilepsia, isquemia cerebral que son capaces de estimular la generación de nuevas neuronas en el cerebro adulto en regiones distintas del bulbo olfatorio y de la capa granular del DG actuando quizás como un mecanismo reparador (Beaquis y col., 2010), (Koehl & Abrous, 2011; Lledo y col., 2006; Ming & Song, 2005; Suh y col., 2009; Henriette van Praag y col., 2002). Otros factores que también disminuyen el proceso de NA son por estrés psicosocial crónico (Schloesser, y col. 2010), por procesos de envejecimiento, neuropatologías como Alzheimer, Parkinson o Huntington, consumo de alcohol, drogas o la exposición a fármacos antimetabólicos (Akers y col., 2011; Akers, y col, 2010; Anderson, y col., 2012; Cancino y col., 2013; Chohan y col., 2011; Martínez-Canabal, y col, 2013; Ming & Song, 2005; Monje & Dietrich, 2012).

Por todo lo anterior, el conocimiento de los mecanismos de activación y modulación de la neurogénesis endógena es fundamental para el diseño de futuras terapias encaminadas a combatir los daños cerebrales y las enfermedades neurodegenerativas por movilización de células madre o progenitores endógenos.

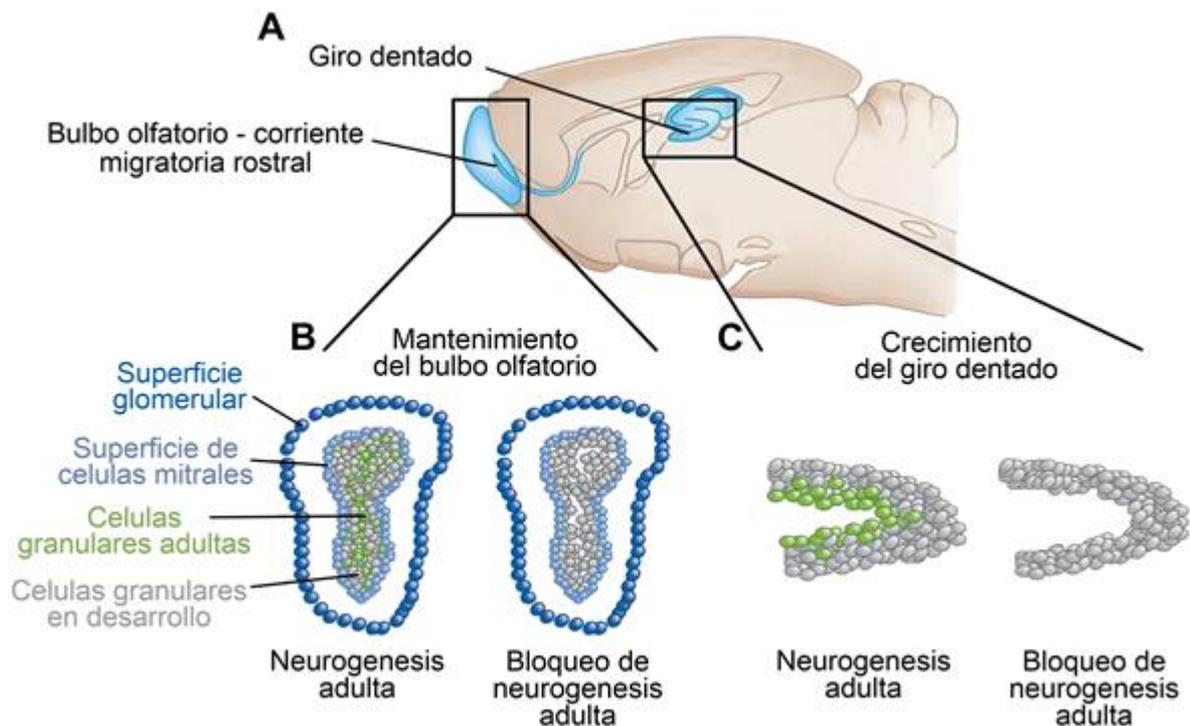


Figura 9. Sitios de neurogénesis en el cerebro del ratón. Editado de Frankland & Miller, 2008.

Se reporta de forma consistente la incorporación de nuevas neuronas en el hipocampo y el bulbo olfatorio que participan en varias funciones cognitivas. En cuanto al hipocampo su función se ha vinculado principalmente con la memoria en diferentes fases (adquisición, consolidación, reconsolidación y evocación) y con cambios estructurales (moleculares y sinápticos) que subyacen a este proceso (Frankland y col., 2006). Se ha reportado también que las memorias declarativa, episódica, contextual y espacial dependen de los procesos en el hipocampo (Abdallah y col., 2007; Frankland y col., 2013; Koehl & Abrous, 2011). Quizás una de las funciones más sobresalientes está relacionada con la generación de fenómenos de plasticidad cerebral; potenciación y depresión a largo plazo (Dityatev y col., 2004; Ming & Song, 2005; Nai y col., 2010).

Se ha observado en otros estudios que la neurogénesis es crítica para la separación de patrones, dicho tema será abordado con mayor detalle más adelante. En general, cuando los animales están sujetos a intervenciones que disminuye la neurogénesis, se ven afectados en la separación de patrones, cuando la discriminación es sutil (Clelland y col., 2009; Clemenson y col., 2015; Nakashiba y col., 2012; Tronel y col. 2012), mientras que el aumento de la neurogénesis mejora la separación de patrones cuando la discriminación es sutil (Creer, Romberg, Saksida, van Praag, & Bussey, 2010, Sahay, Scobie, y col., 2011) Sin embargo, contrariamente a esta simplificación, el aumento de la neurogénesis también puede resultar en un déficit en la discriminación para tareas más fáciles, aparentemente porque el animal sobregeneraliza una respuesta (Clemond y col., 2015).

1.4.3 Caracterización de las capas del nicho neurogénico del Giro Dentado

En particular el DG adulto es el único lugar donde se desarrolla el proceso completo de neurogénesis.

El cerebro adulto posee nichos neurogénicos, ya que las neuronas nuevas se generan en la zona subangular (SGZ) del DG hipocampal y las zonas subventriculares (SVZ, por sus siglas en inglés) de los ventrículos laterales (Altman y col. 1965). Después de madurar, las neuronas ‘recién nacidas’ migran y se integran hacia la capa granular de células (GCL) del DG (Goncalves y col., 2016). Las neuronas nuevas derivan de los NPC (progenitores neurales), una población de células inactivas que reside en el nicho neurogénico de la SGZ del DG. Estas células inactivas son descritas también como astrocitos radiales, células gliales radiales, células tipo 1 y progenitores neurales quiescentes (Eckenhoff, y col 1984), (Kempermann, G., y col., 2004), tienen características astrogliales bajo microscopía electrónica y de luz, y expresan algunos marcadores en común con los astrocitos (p. ej., proteína ácida fibrilar glial / GFAP y vimentina) (Kempermann, G., y col., 2004), (Kriegstein, A. y col, 2009). Sin embargo, difieren de los astrocitos del hipocampo maduro en su morfología, su perfil de expresión (por ejemplo, la expresión de nestina) y su capacidad para producir neuronas. Los NPC se dividen asimétricamente para dar lugar a progenitores neurales amplificadores y otros NPC y después de más divisiones salen del ciclo celular y se convierten en astrocitos.

El nicho neurogénico del DG hipocampal ha sido caracterizado previamente utilizando bromodeoxiuridina (BrdU) e inmunohistoquímica (IHQ) contra marcador de neuronas jóvenes Doblecortina (DCX) y el marcador de neuronas maduras NeuN, revelando los cambios en la neurogénesis que se dan en el DG con el envejecimiento (Bonaguidi y col, 2011; Suh y col., 2007; Encinas y col., 2011).

La DCX es una de las proteínas encargadas de la estabilidad de los microtúbulos, específicamente expresada en el proceso de migración y diferenciación neuronal (Moore y col. 2006) y es estabilizada como un marcador para neuronas inmaduras. La expresión de DCX está asociada con las neuronas que se encuentran en la zona granular proliferativa del DG, al destino fisiológico de estas neuronas (capa de células granulares) y a la región CA1 del cuerno de Amón, que es el principal sitio de patología hipocámpica en la EA.

La DCX está ausente en las células granulares maduras. Toda la migración parece ocurrir durante el período de expresión de DCX, pero la mayoría de las nuevas células permanece dentro del tercio interno de la capa de células granulares (Kempermann y col. 2003). Dado que DCX está localizado en el citoplasma de neuronas inmaduras, su morfología se vuelve apreciable en estudios inmunohistoquímicos con anticuerpos contra DCX (Brandt MD y col. 2003; Couillard-Despres S y col. 2005; Braown JP y col. 2003). En condiciones naives, es decir, la ausencia de estímulos neurogénicos, el DG de un ratón C57BL/6 de 2 meses de edad, contiene aproximadamente 7000 células DCX+ (Kronenberg G, y col.2006). Con el aumento de la edad, cuando la neurogénesis adulta disminuye, el número total de las células positivas para DCX se reduce a solo 120 a la edad de 2 años. A los dos meses de edad, aproximadamente el 17% de todas las células en división en la zona subgranular (SGZ) del giro dentado eran DCX+ (Kronenberg G, y col. 2006).

Específicamente, en trabajos de Rao y col. se observó que, por un lado, independientemente de la edad, las neuronas inmaduras expresan DCX por aproximadamente 12 días, sufriendo posteriormente un aclaramiento progresivo de DCX; el 80% de las células que habían incorporado BrdU se convirtieron en DCX (+) y subsecuentemente en neuronas NeuN (+); y el 50% de las neuronas ‘recién nacidas’ sobrevivieron por los menos 5 meses. Por otro lado, se observó que, con el envejecimiento, las neuronas ‘recién nacidas’ presentan una migración lenta pero finalmente expresan NeuN y se incorporan eventualmente a la GCL (capa granular de células). Por lo tanto, en este trabajo se demostró, en el hipocampo viejo, que la principal causa de la caída en la neurogénesis no es la sobrevida celular, sino la disminuida tasa de división mitótica de las NSCs (Rao y col., 2005). En la zona del giro dentado las neuronas forman tres capas claramente definidas:

-La capa principal es la **capa de las células granulares** cuyas dendritas se extienden perpendicularmente a la capa superficial (molecular) y sus axones componen las denominadas fibras Mossy.

-La **capa molecular**, se encuentra ubicada sobre la capa principal

-La **capa de las células polimórficas o hilio**, se ubica debajo de la capa de las células granulosas

Por su parte, la capa principal del hipocampo es la **capa de células piramidales**. En ella se agrupan los somas de las neuronas piramidales excitatorias, en forma de una C invertida, en la cual se encuentran las regiones CA1, CA2, CA3 y CA4. (Figura 10 a y b)

Las capas de células no piramidales del hipocampo contienen un número pequeño de neuronas. Estas neuronas tienen somas con diferentes morfologías y presentan distintos patrones de arborización dendrítica y axonal (Ramón y Cajal, 1905).

En el giro dentado y en el hipocampo existen numerosas interneuronas, que interactúan con ellas, donde la gran mayoría, son GABAérgicas y se presentan en diversas variedades, como por ejemplo, las células piramidales en canasto, que se ubican en el borde interno del giro dentado, inervan a los somas de las células granulares y son capaces de inhibir simultáneamente un elevado número de células granulares; o las células Mossy, que se ubican en la capa de las células polimórficas y aunque son consideradas como interneuronas excitadoras, en realidad se trata de neuronas de proyección.

La información fluye a lo largo de la formación hipocampal por medio de tres vías principales:

-La **vía perforante (VP)**: circula desde la corteza entorrinal (CE) a las células granulares del giro dentado.

-La **vía de las fibras de Mossy o musgosas**: circula desde las células granulares del DG a las células piramidales de la región CA3

-La **vía colateral de Schaffer**: proyecta desde las células de la región CA3 a las de la región CA1.

El circuito de la formación hipocampal se inicia en las neuronas de la capa II de la CE. Los axones de estas neuronas se proyectan hacia el DG a través de la vía perforante. Las células

granulares del DG envían proyecciones a las células piramidales de CA3 a través de las fibras musgosas y luego la información se transmite a las células piramidales CA1 a través de la vía colateral de Schaffer. Las neuronas piramidales CA1 envían axones al subiculum y a las capas profundas de la CE, desde donde la información cierra el circuito volviendo al hipocampo (Figura 9 y 10). Ésta última es la que se daña en mayor grado en la EA y es el sitio del inicio de la afección.

El DG del hipocampo adulto tiene la capacidad adicional de modificar sus conexiones mediante la adición de nuevas neuronas. Por lo tanto, la remodelación de la red no se limita a las sinapsis, sino que también incluye la incorporación de nuevas unidades funcionales (neuronas) que proporcionan una dimensión adicional de plasticidad al circuito hipocampal existente. (Schinder y col., 2004; Piatti y col., 2006).

Aunque la VP es la aferencia principal a la formación del hipocampo, existe otra vía de entrada de información, **vía temporoamónica (TA)**, donde las neuronas ubicadas en la capa III de la CE proyectan directamente a CA1 y al Sb (Figura 10 y 11).

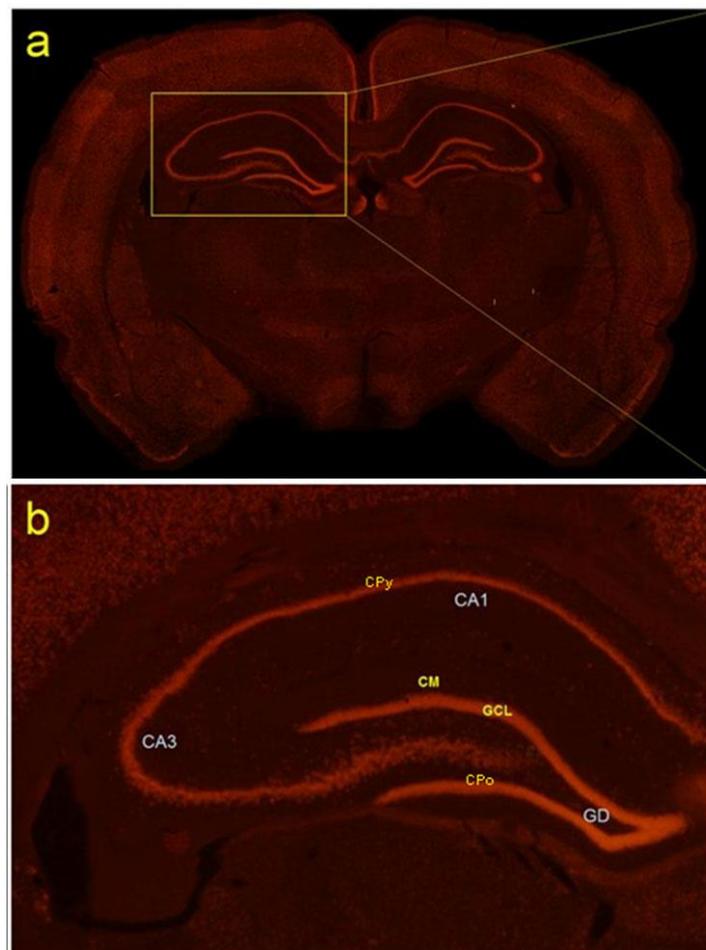


Figura 10. Ilustración de la formación hipocampal en un corte coronal del hipocampo de rata. a) Vista panorámica de la distribución de la marcación de NeuN en un hipocampo dorsal, observándose las neuronas principales del hipocampo. Reconstrucción del cerebro entero de varias imágenes tomadas de un objetivo 4x. **b)** Hipocampo dorsal a una mayor magnificación donde se distingue la capa de células piramidales (CPy), la capa de células moleculares (CM), la capa de células granulares (GCL) y la capa polimórfica (CPo) con un objetivo 10x.

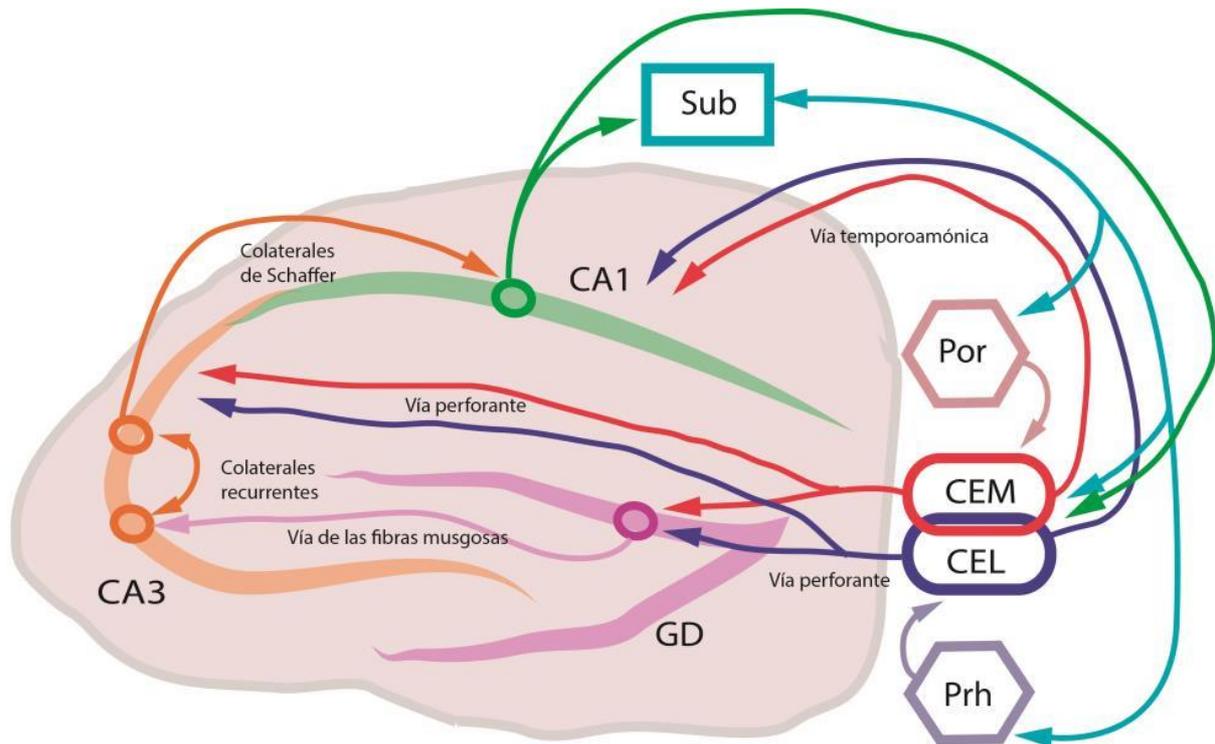


Figura 11: Diagrama esquemático representando el hipocampo y las distintas vías anatómicas presentes en la rata. En el diagrama se observan las distintas subregiones hipocámpicas y puede verse la vía trisináptica clásica, que consiste en la proyección desde la corteza entorrinal (CEL: corteza entorrinal lateral; CEM: corteza entorrinal medial) hasta el GD, desde el DG hasta la región de CA3 del hipocampo y desde la CA3 hasta la región de CA1. La CE también tiene proyecciones monosinápticas directas a CA3, CA1 y al subículo (Sub). La proyección CA1 a Sub y a CEL / CEM y las proyecciones de Sub a CEL / CEM completan el circuito. Las vías de la CE al GD, CA3, CA1 y Sub se conocen como vía perforante, la vía del DG a CA3 como la vía de las fibras musgosas, y las proyecciones de CA3 a CA1 como las colaterales de Schaffer. Además de proyectar hacia CA1, las células piramidales de CA3 proyectan a otras células piramidales de CA3, lo que se conoce como colaterales recurrentes.

1.4.4 El circuito trisináptico del hipocampo

Hay un clásico circuito trisináptico de transmisión sináptica en el hipocampo, que se compone de tres grupos de células principales, dos neuronas y un astrocito como unidad funcional (Araque A, y col., 1999): células granulares, neuronas piramidales CA3 ("Cornu Ammonis" área 3) y células piramidales CA1 ("Cornu Ammonis" área 1). El relevo del hipocampo involucra 3 regiones dentro del hipocampo que se clasifican según el tipo de célula y fibras de proyección. La primera proyección del hipocampo ocurre entre los axones de la corteza entorrinal y las dendritas del DG (sinapsis 1). La corteza entorrinal transmite sus señales desde la circunvolución parahipocámpal al DG a través de células granulares, fibras conocidas como vía perforante. El DG después hace sinapsis con las dendritas de las células piramidales en la región CA3 a través de fibras musgosas (sinapsis 2). Los axones de las células piramidales CA3 forman las vías colaterales de Schaffer que disparan a las células piramidales CA1 (sinapsis 3). La salida de CA1 va al subículo, y desde el subículo, la actividad sale del hipocampo para apuntar a la corteza entorrinal (formando un bucle) y áreas subcorticales y corticales más distantes (Amaral DG, y col. 1995). Cualquier cambio patológico en el este

circuito desencadena alteraciones neurológicas como deterioro de la memoria y epileptogénesis (Llorens-Martín M, y col. 2015). En este tipo de sinapsis, los neurotransmisores liberados por las neuronas también se unen a los receptores de los procesos de los astrocitos adyacentes, activando las vías de señalización en los astrocitos que modulan comportamiento sináptico (Araque A, y col., 1999; Papouin T, y col., 2017). Por tanto, el circuito trisináptico es de gran interés como un objetivo para el tratamiento de las enfermedades neurológicas causadas por la alteración en este circuito. La entrega eficiente de genes terapéuticos en este circuito con expresión a largo plazo brinda una oportunidad especial para reparar las interrupciones de este circuito. (Figura 11)

1.4.5 Hipocampo y corteza retroplenial, entorrinal y perirrinal en la EA

Corteza retroplenial

La corteza retrosplenial (CR), en roedores, comprende a la corteza cingulada posterior y constituye una de las regiones más largas de la corteza cerebral (Vogt BA, y col 1981). Tanto en humanos como en ratas, su ubicación central la vuelve especialmente posicionada para recibir información e influir fácilmente en muchas regiones claves del cerebro, responsables del procesamiento de información espacial. En efecto, la CR se encuentra conectada con el hipocampo y las regiones neocorticales (Allen Brain Atlas, <http://www.brain-map.org/>).

La función de la CR es la de procesar la información espacial y la recuperación de recuerdos. Los modelos animales (en particular los experimentos con roedores) jugaron un rol esencial en el entendimiento de dichas funciones (AnnaS Mitchel, y col. 2018) De hecho, el análisis de la activación de los genes tempranos del cerebro inducidos por el aprendizaje en roedores intactos, luego de que los animales hayan realizado test de comportamientos, revelaron el rol importante que tiene la CR en la memoria espacial. (Vann SD y col. 2000); (Maviel T, y col. 2004). Asimismo, estudios con ratas sometidas a tareas de condicionamiento por miedo demostraron que la CR es necesaria para la consolidación de la memoria y su almacenamiento a largo plazo. (Katche C, y col 2013); (Katche C, y col. 2017). Por lo tanto, no resulta sorprendente que la función de esta corteza este afectada en patologías asociadas con la pérdida de memoria y desregulación metabólica, tales como la EA (Yasuno F, y col. 1998); (Paxinos G).

Corteza entorrinal

La corteza entorrinal (CE) forma parte de la corteza temporal y se encuentra íntimamente relacionada con el hipocampo, transmitiendo información cortical, pero a su vez también está recibiendo y redirigiendo información proveniente del hipocampo hacia otras áreas de la corteza (Preston AR y col. 2013). Es así como esta corteza también se ve implicada en los procesos de memoria y aprendizaje espacial.

La CE es la más afectada en la EA, mostrando una alta densidad de ovillos neurofibrilares y placas neuríticas (Fukutani Y, y col.1995). Además, en pacientes con EA se demostró una disminución en un 40 % del volumen de la CE acompañado de una disminución de número de

neuronas en dicha corteza (Juottonen K, y col. 1998); (Deshmukh SS, y col. 2011). Más aún, se ha observado que las neuronas que interconectan el hipocampo con la CE se encuentran afectadas en dichos pacientes, por lo que la comunicación entre estas dos estructuras se ve interrumpida; lo cual, a su vez, podría contribuir al deterioro cognitivo característico de la enfermedad (Hyman BT, y col. 1984).

En cuanto a los roedores, se ha demostrado que la CE también juega un rol importante tanto en la cognición espacial como la no espacial (Van Cauter T, y col, 2013); (Yeh CY, y col. 2011). En un modelo transgénico de EA en ratones se ha observado en la CE un decrecimiento del área y del volumen de GFAP a partir de un mes de edad, lo que indica una atrofia temprana en los astrocitos de estos animales (Kealy J, y col. 2011).

Corteza Perirrinal

En la rata, la corteza perirrinal (CPR) forma parte de la región parahipocampal y contribuye junto con la CE con proyecciones hacia el hipocampo, resultando consecuentemente en una estructura clave para el procesamiento de la información (Norman G, y col. 2004). De hecho, esta corteza es vital para la memoria de reconocimiento de un objeto nuevo (Ennaceur A y col. 1997); (Cuadrado-Tejedor y col. 2014).

La CPR también se ve afectada en los pacientes con EA, ya que es una de las primeras áreas en exhibir placas neuríticas, ovillos neurofibrilares y pérdida neuronal, además de mostrar una reducción del 27% de su volumen comparado con los controles. (Fukutani Y, y col. 1995)

1.5 Terapia génica

1.5.1 Generalidades

La terapia génica se define como la transferencia de material genético con fines terapéuticos y tiene numerosas aplicaciones en las ciencias básicas y en la clínica. Típicamente, se refiere al uso de ácidos nucleicos para incrementar, disminuir o suprimir la expresión de una proteína de interés (De Laporte, Cruz Rea y Shea 2006). 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 col., 1995; Basarkar y col., 2007). Este objetivo puede lograrse, típicamente, mediante la producción de una proteína o RNAm para reemplazar o suplementar el producto de un gen que está ausente o defectuoso (Dubé y col., 1995). Se puede transferir una diversidad de ácidos nucleicos, tales como genes, oligonucleótidos, ribozimas, optámeros y ARN pequeños de interferencia (Patil, Rhodes y Burgess 2005; Basarkar y Singh 2007).

La terapia génica puede realizarse por medio de estrategias “*ex vivo*” o “*in vivo*”. En las estrategias “*ex vivo*”, se le extraen al paciente las células blanco o células madre e *in vitro* se les transfiere el material genético (terapéutico); luego estas células son reintegradas al organismo. Estos métodos mejoran la eficiencia de la transferencia génica y minimizan la

respuesta inmunológica. Sin embargo, están limitados a las células que están disponibles para su extracción o al cultivo a partir de células madre (Raty y col. 2008). En las estrategias “*in vivo*” el material genético se administra directamente al paciente utilizando distintos métodos de transferencia de ácidos nucleicos (Crystal 2014).

La terapia génica ofrece ventajas únicas para la transferencia a largo plazo de factores neurotróficos, tales como IGF-I a regiones específicas del SNC. Existen vehículos de transferencia génica no virales, tales como DNA y RNA ‘desnudos’, liposomas y nanopartículas, los cuales permiten llevar una carga de material genético y son menos costosos que las partículas virales; sin embargo, sólo permiten obtener una baja expresión génica y durante tiempos cortos (Bergen y col., 2008). Por otra parte, se han diseñado un gran número de virus modificados genéticamente, los cuales permiten una eficiente expresión génica en las células huésped diana. Los vectores virales más comúnmente utilizados son adenovirus recombinantes, adenovirus ‘Helper dependent’(HD), virus adeno-asociados, lentivirus, retrovirus y virus recombinantes helpers. Con estos vectores es posible obtener una alta expresión transgénica durante tiempos prolongados (Simonato y col., 2013).

En general, la captación celular de moléculas de ADN desnudo y polinucleótidos, independiente de sus tamaños, sigue siendo un proceso ineficiente. Además, estas moléculas son inestables *in vivo*, por ser rápidamente degradadas por exo-y endonucleasas hidrolíticas (Patil, Rohodes y Burgess 2005). Consecuentemente, se han desarrollado numerosas estrategias de transferencias de polinucleótidos para facilitar la inserción de dichas moléculas en las células blanco y protegerlas así de la degradación celular. El tipo de molécula terapéutica y el propósito clínico que se persigue, determinan la elección de la estrategia a utilizar. Efectivamente, el mayor desafío de la terapia génica es el desarrollo de métodos que transfieran un gen terapéutico (transgen) a las células seleccionadas y que logren una apropiada expresión del gen, sin generar efectos perjudiciales (Gao, Kim, y Liu 2007).

Los métodos de transferencia de ácidos nucleicos pueden ser clasificados en físicos y en vectoriales. Generalmente, los métodos físicos inducen lesiones transitorias o defectos en la membrana celular para facilitar el ingreso, por difusión, del ADN a las células blanco (Gao, Kim y Liu 2007). Los sistemas de transferencia génica vectoriales, como su nombre lo indica, utilizan vectores 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 puede funcionar correctamente. Los vectores pueden ser clasificados en: vectores no virales y vectores virales.

La mayoría de los vectores no-virales incluyen el uso de polímeros y lípidos para transferir el material genético al interior celular, protegiendo al ADN de la degradación enzimática (Basarkar y Syngh 2007) Estos vectores deben superar múltiples barreras a nivel sistémico, tisular y celular, que reducen la eficiencia de la transferencia génica hacia el núcleo. Además, en cada paso se pierde una cantidad significativa de ADN que finalmente resulta en la disminución de la expresión terapéutica del transgen (Basarkar y Syn 2007; Bergen y col. 2008). Los virus en cambio están altamente diferenciados en la transferencia de ácidos nucleicos por lo que la realizan con alta eficiencia. Esta es la principal ventaja de la utilización

de virus como vectores de transferencia génica. Sin embargo, también poseen desventajas como la respuesta inmune que desencadenan, la limitación en el tamaño del transgen que pueden transportar, lo dificultoso de su producción a escala industrial y la potencial mutagénesis insercional que puede producir (Patil, Rhodes y Burgues 2005; Gao, Kim y Liu 2007; Basarkar y Singh 2007).

1.5.2 Vectores Adenovirales

Los adenovirus (AD) pertenecen a la familia *Adenoviridae*, siendo los que infectan a mamíferos del género *Mastadenovirus*. Entre los más de cincuenta serotipos descritos (Davison, Benko y Harrach 2003), el más comúnmente utilizado como vector para la transferencia de genes es el AD5 (Lentz, Gray y Samulski 2012). Las partículas adenovirales poseen un tamaño de 70 a 100 nm de diámetro; consisten en una cápside desnuda formada por tres subunidades, el hexon, el penton y la fibra (Figura 12) (Schaffer, Koerber y Lim 2008). Actualmente, más de 51 serotipos de AD han sido aislados en humanos y no humanos y se los han clasificado en subgrupos (de la A a la F).

El genoma de los AD consiste en ADN lineal de doble cadena de 30 a 38 kpb de tamaño y, en el extremo 5' de cada cadena, se halla unida covalentemente una proteína terminal de 55 kDa. Así mismo, el genoma de los AD presenta en sus extremos repeticiones terminales invertidas (ITRs) de aproximadamente 100pb, esenciales para la replicación del genoma viral (Krasnykh, Douglas y van Beusechen 2000; Shayakhmetov y col. 2005).

Los AD son capaces de infectar una amplia variedad de tipos celulares (Crystal 2014). El AD se une a una célula blanco, inicialmente, por la interacción del botón terminal de la fibra viral con receptores celulares de superficie denominados CAR. Los CAR son un tipo de proteína transmembrana de la superficie de las inmunoglobulinas que intervienen en la endocitosis de la mayor parte de los AD (Bergelson y col. 1997). En adición a estos receptores primarios, las integrinas de la célula hospedadora sirven como co-receptores para la entrada de los AD (Hidaka y col. 1999).

Finalmente, el virión se une específicamente al complejo del poro nuclear y el ADN viral ingresa al núcleo (Campos y Barry 2007). En el núcleo, el genoma viral permanece en un estado no integrado o episómico, y comienza los procesos de transcripción de los genes virales y de replicación del genoma viral. La transcripción de los genes de los AD 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 (Ay B), E2 (Ay B), E3 y E4, son aquellos que se expresan antes de la replicación del ADN y en su mayoría codifican para proteínas involucradas en la transcripción y 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, 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.

La fase tardía en el ciclo infeccioso de los AD se inicia con el comienzo de la replicación viral. Se han desarrollado diversas estrategias para la generación de vectores adenovirales recombinantes (RAds), las cuales se basan en efectuar modificaciones en el genoma viral en el que subsecuentemente se clona el transgen de interés. La mayor parte de los trabajos con RAds se basó en el uso de AD humanos tipo 2 y 5 (Glasgow, Everts y Curiel 2006; Schaffer, Koerber y Lim 2008). Esto se debe a que sus genomas se encuentran sumamente bien caracterizados y a que mostraron no inducir tumores en modelos animales (Seth 1999). Los primeros vectores AD en construirse se basaron en supresiones de los genes tempranos E1 y E3 del genoma viral, denominados vectores adenovirales de primera generación. La eliminación de la región E1 lleva a la incapacidad del virus para replicar y generar progenie (Yeh y Perricaudet 1997; Benihoud, Yeh, y Perricaudet 1999) y la supresión de la región E3 genera más espacio dentro del genoma para clonar secuencias exógenas (hasta 7.5kpb) (Seth 1999). En consecuencia, estos RAds son incapaces de replicarse (replicación defectivos) evitando así la infección viral generalizada. Generalmente, el sistema utilizado para construir el genoma adenoviral de primera generación (E1, E3) se basa en la recombinación homóloga entre un plásmido shuttle, el cual consiste en los extremos del genoma de los AD, y el casquete de expresión del transgen en el lugar de la región E1, y un plásmido genómico, el cual consiste en la mayor parte del genoma del AD, excepto por las regiones E1 y E3 (Crystal 2014). (Figura 12)

Estos RAds pueden replicarse en líneas celulares específicas, como la línea celular transgénica embrionaria derivada de riñón humano 293 (HEK 293), que contiene la región genómica E1 faltante del AD5 y, por lo tanto, expresa los genes necesarios para iniciar la replicación (Graham y col., 1992). En dichas células se pueden amplificar los RAds, obteniéndose títulos muy elevados (Campos y col., 2007). (Figura 12)

Un factor importante para considerar en los estudios *in vivo*, con animales de experimentación, es la duración de la expresión del transgen mediada por AD. Generalmente, el nivel de expresión del transgen tiene un pico de expresión durante los primeros 7 días y disminuye rápidamente a valores indetectables entre la segunda y la cuarta semana. Esto se observa para la mayoría de las rutas de administración con la excepción de la inyección directa en tejido inmunoprivilegiados, tal como lo es en el cerebro (Crystal 2014).

Los RAds cuentan con algunas ventajas respecto a los otros vectores virales: i) Son capaces de transducir eficientemente un amplio rango de tejidos y tipos celulares, en estado proliferativo o quiescente; ii) poseen una gran capacidad de clonado; iii) son fáciles de manipular en el laboratorio; iv) son factibles de producirse en títulos elevados; v) el genoma de los RAds no se integra al genoma de la célula huésped, permanece en un estado episomal, descartando el riesgo de mutagénesis insercional; y vi) poseen una alta eficiencia de expresión génica (Yeh y col., 1997; Benihoud y col., 1999; Schaffer y col., 2008). Sin embargo, los vectores AD poseen una importante limitación, la intensa respuesta inmune que inducen en el hospedador, dirigida contra la partícula viral y las células infectadas. Como consecuencia de dicha respuesta se limita la duración de la expresión del transgen (la cual generalmente es transitoria).

RA_d(IGF-1)

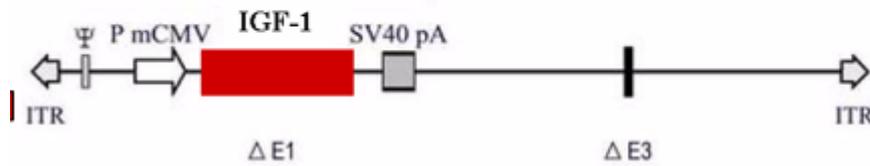


Figura 12: Representación diagramática del genoma de RA_d. En el sitio de delección E1 se insertó minicassette de expresión constituido por el promotor del citomegalovirus murino (A, B y C), el promotor del citomegalovirus humano (D), y el promotor del virus del sarcoma de Rous (E) seguido del gen correspondiente para el vector. ITR (Inverted terminal repeats) ΔE1 y ΔE3: deleciones en el genoma del Ad V, SV40pA: señal de poliadenilación del virus de simio SV40: φ o Ad IX: Señal de encapsidación.

1.5.3 Factores tróficos

Factor de crecimiento simil Insulina Tipo 1 (IGF-1)

El IGF-1 es un polipéptido que pertenece a la familia de la insulina (Blundel y Humel 1980) y es sintetizado en múltiples órganos incluyendo el hígado, pulmones, riñones, timo, corazón, músculos, gónadas y cerebro (D' Ercole, Stiles y Urderewood 1984).

En el hombre y de manera similar en ratas, el IGF-I circulante es un péptido con un PM de 7649 Da (Figura 13) y, tal como la insulina, posee cadenas A y B conectadas por 2 puentes disulfuros (Rinderknech y col., 1978). El IGF-I se une, al menos, a 2 receptores celulares de IGF-I (IGF-IR) y el receptor de insulina.

Sin embargo, la mayoría del IGF-1 circulante es secretado por el hígado en respuesta a la hormona de crecimiento (GH). De esta forma, el IGF-1 media la actividad anabólica y mitogénica de dicha hormona, ejerciendo acción paracrina en los diferentes tejidos (Laron 2001). Se sabe que la insulina circula libre en sangre, mientras que los IGFs circulan unidos a proteínas transportadoras de IGFs (IGFBPs, por sus siglas en inglés). En general, la insulina y los IGFs tienen una acción periférica en la cual regulan el metabolismo energético y el remodelado de tejidos. No obstante, en los últimos años se han descubierto otras funciones de estos péptidos en el cerebro cómo se describirán a continuación.

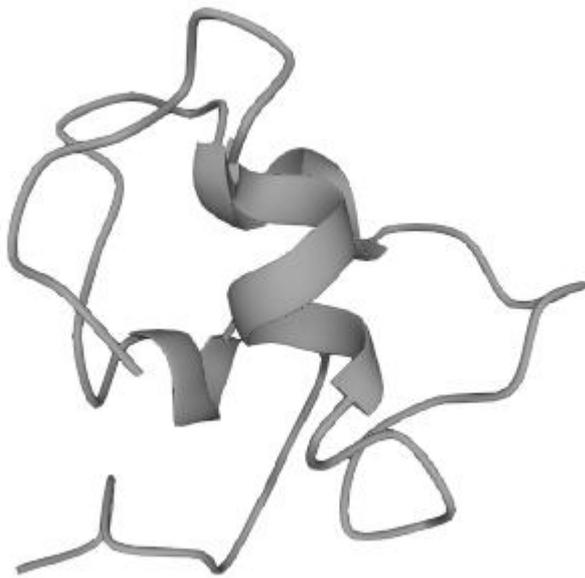


Figura 13: Estructura tridimensional del IGF1 compuesta por 2 subunidades alfa extracelulares y 2 subunidades beta. Ambas subunidades alfa poseen sitios de unión al IGF-I y están conectadas por puentes disulfuro. Las cadenas beta poseen un dominio extracelular pequeño, un dominio transmembrana y un dominio intracelular. Imagen extraída de <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P05019/feature-viewer>.

IGF-1 en el sistema nervioso central

El IGF-1 es un potente factor neurotrófico y neuroprotector, considerado de interés para el rescate neuronal en procesos neurodegenerativos (Carro y col. 2006). El IGF-1, el R-IGF-1 y las IGFbps están localizados y son sintetizados en el SNC, pudiendo actuar de manera paracrina en algunas áreas del cerebro (Marks, Porte y Baskin 1991; Ocran, Fay y Parmelee 1990). El IGF-1 posee acciones neurotróficas observadas en cultivos de líneas celulares neuronales y en cultivos primarios neuronales, tales como la proliferación celular, la supervivencia, el crecimiento de neuritas y la diferenciación (Werther, Cheesman y Russo 1993; Torres-Aleman, Naftolin y Robbins 1990; Torres-Aleman, Pons y Santos-Benito 1992; Brooker y col. 2000). También se ha demostrado que el IGF-1 es un modulador específico de la formación de sinapsis, la liberación de neurotransmisores y la excitabilidad neuronal (O'Kusky, Ye y D' Ercole 2000; Torres-Aleman 1999)

Después del nacimiento, la expresión de IGF-1 desciende hasta alcanzar niveles muy bajos en el cerebro adulto (Miller y Gore 2001). Sin embargo, en respuesta a diferentes daños, el cerebro produce factores de crecimiento, incluyendo el IGF-1 (Kazanis y col. 2004). La lesión electrolítica del hipocampo induce un aumento del IGF-1 extracelular en la zona lesionada (Yamaguchi y col. 1991). De manera similar, se sabe que, en condiciones de daño citotóxico del hipocampo, la microglía de esta región aumenta sustancialmente la producción de IGF-1 (Breese y col. 1996). Además, se ha demostrado que, en situaciones de estrés oxidativo, el IGF-

1 ejerce una acción protectora sobre los astrocitos y, de esta forma, colabora con ellos en la producción neuronal (Genis y col. 2014).

El descenso en los niveles cerebrales de IGF-1 se relaciona con el deterioro de las funciones cognitivas asociadas al envejecimiento y a otras enfermedades neurodegenerativas (Rivera y col. 2005; Steen y col. 2005). En la enfermedad de Parkinson, por ejemplo, el IGF-1 demostró estar involucrado en la protección neuronal contra la degeneración que presentan las neuronas dopaminérgicas en esta patología (Ebert y col. 2008; Fan y col. 2018).

Por otro lado, se ha empleado la inyección icv del IGF-1 en diferentes modelos experimentales con fines neuroprotectores. Precisamente, estudios de isquemias cerebrales inducidas en ratas han revelado que la administración del IGF-1 reduce un 40 % el volumen del infarto cerebral (Brywe y col. 2005; Kooijman y col. 2009). En ratas seniles, la administración del IGF-1 restaura la tasa de neurogénesis en el hipocampo (Lichtenwalner y col 2001) y, parcialmente, su déficit cognitivo (Markowska, Mooney y Sonntag 1998).

Gradualmente se está acumulando evidencia que le otorga al IGF-1 un papel sumamente relevante en la EA. Debido a que el IGF-1 sérico entra en el cerebro de una manera actividad-dependiente (Nishijima y col. 2010) ya que la actividad del cerebro está desregulada en la EA (Jones y col. 2011), es probable que el tráfico del IGF-1 sérico al cerebro se encuentre perturbado (Zemva y Schubert 2014; Trueba-Saiz y col. 2013). Esto concuerda con una reducción en la relación del IGF-1 en el LCR (líquido cefalorraquídeo) /plasma de pacientes con EA (Johansson y col. 2013; Westwood y col. 2014). Por otra parte, cuando se evaluó el efecto del IGF-1 sobre cultivos de neuronas hipocampales de rata tratados con derivados del péptido beta A, fue posible prevenir y rescatar a los cultivos del daño neurotóxico (Dore, Kar y Quirion 1997). En ratones transgénicos que sobreexpresan el péptido β A, el IGF-1 protege a las neuronas del hipocampo de los efectos tóxicos de dicho péptido (Dore, Kar y Quirion 1997) y reduce su carga cerebral, así como la gliosis asociada a las placas amiloides, mejorando la performance cognitiva de los animales (Carro y col. 2006). En conjunto toda la evidencia existente justifica la utilización del IGF-1 como agente neuroprotector.

Terapia génica con IGF-1

Un estudio de nuestro grupo, utilizando un vector adenoviral recombinante portador del gen para el IGF-1 de rata (RAd-IGF-1), demostró que la ruta ependimaria es una estrategia efectiva para incrementar los niveles de IGF-1 en el LCR (Hereñu y col. 2009). Se evaluó entonces la terapia génica icv con IGF-1 en ratas seniles observándose un impacto beneficioso en el desempeño motor de los animales (Nishida y col. 2011). Así mismo, se evidenció una mejora significativa en la memoria espacial de ratas seniles luego de la terapia icv con Rad-IGF-1, junto con un incremento de la neurogénesis y de la arborescencia astrocitaria hipocampal (Pardo y col. 2016). Luego, se llevó a cabo un primer abordaje de terapia con IGF-1 a largo plazo para tratar memoria espacial en ratas viejas, el secuenciamiento de ARN de hipocampo total demostró numerosos genes relacionados con la plasticidad sináptica y función neuronal en general, están diferencialmente expresados en dichas ratas tratadas con el Rad-IGF-1 (Pardo y col. 2017).

Se ha demostrado previamente que la terapia génica con IGF-1 en el hipotálamo de ratas hembra seniles con neurodegeneración dopaminérgica es altamente efectiva para restaurar la función neuronal hipotalámica involucrada en el control inhibitorio de la prolactina, corrigiendo de este modo la hiperprolactinemia crónica en estos animales (Hereñu y col.2007).

En un trabajo adicional de nuestro laboratorio, se estudió el impacto de las terapias génicas con IGF-1 sobre el eje hipotalámico-ovárico en ratas de mediana edad, reproductivamente competentes; la sobreexpresión de IGF-1 en el hipotálamo medio basal de ratas hembra de mediana edad, prolongó la función ovárica (Rodríguez y col. 2013). En base a estos resultados, consideramos al estudio de la terapia génica con IGF-1 como un abordaje sumamente relevante en nuestros modelos de neurodegeneración.

1.5.4 Terapias protectoras de la función cognitiva

Acción restaurativa de la terapia génica para el factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I) sobre la performance cognitiva y la morfología hipocampal en la rata hembra senil.

En ratas, el aprendizaje y el rendimiento de la memoria disminuyen durante el envejecimiento, lo que hace que esta especie de roedor sea un modelo adecuado para evaluar estrategias terapéuticas para corregir los déficits cognitivos relacionados con la edad. Algunas de estas estrategias involucran factores neurotróficos como IGF-I. En el laboratorio se implementaron 18 días de terapia génica icv de corto plazo con IGF-I, usando RAd que expresan el gen terapéutico para IGF-I de rata o el gen reportero DsRed (*Red fluorescent protein*), en ratas hembra Sprague-Dawley (SD) de 28 meses de edad, y se evaluó el rendimiento de la memoria espacial en el laberinto de Barnes. También se estudió la morfología del hipocampo utilizando métodos basados en la estereología. Después del tratamiento, el grupo IGF-I mostró una mejora significativa en la memoria espacial en comparación con el grupo DsRed. En la región del giro dentado (GD) del hipocampo, el grupo IGF-I mostró un mayor número de neuronas inmaduras doblecortina positivas (DCX+) que los controles DsRed. El tratamiento redujo el número de los astrocitos con un aumento en la ramificación de los procesos astrocitarios en el stratum radiatum (SR) del hipocampo (Pardo 2016). En la presente tesis, nos propusimos a estudiar otra región del hipocampo, CA3, la cual no ha sido evaluada anteriormente en nuestro laboratorio, es relevante en la recuperación de la memoria episódica.

1.5.5 La rata senil como modelo de estudio para terapias neurorestaurativas

En nuestro laboratorio, contamos con la rata hembra senil de la cepa SD como modelo de envejecimiento. Las ratas hembra SD han sido ampliamente utilizadas en estudios sobre envejecimiento cerebral observándose que el deterioro de la memoria espacial comienza a los 14 meses, con mayor deterioro a los 20-26 meses (Barret y col 2009), estructura hipocampal sumamente relevante en los procesos cognitivos.

Sabemos que la reactividad inmune y los procesos inflamatorios aumentan con el envejecimiento cerebral (Lucin y Wyss-Coray 2009), siendo los astrocitos y la microglía protagonista en esta desregulación inmunitaria, como efector inmune de inflamación y de reconocimiento de antígenos en el cerebro (Streit y col. 2004; Ding y Chen 2010; Norden y Godbout 2013). Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que en las ratas hembra envejecidas sin ninguna existe un aumento significativo de los astrocitos (Morel y col., 2015) y de la microglía reactiva, y, además, se han identificado una serie de genes inmunes hipocampales que están alterados en los animales envejecidos (Pardo y col 2017).

1.6 Importancia de los astrocitos en el envejecimiento

Los astrocitos son un tipo principal de glía, una clase de células cerebrales no neuronales que también incluyen oligodendrocitos, células precursoras de oligodendrocitos (células NG2) y microglía (Barres BA, 2008).

Para investigar más a fondo la morfología y el fenotipo de los astrocitos se utiliza entre otras técnicas inmunohistoquímicas la del marcador GFAP (es una proteína de filamento intermedio de clase III, codificada por un gen en el cromosoma 17q21) para identificar astrocitos inmunoreactivos. El mejor marcador validado de envejecimiento astrocítico es la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), un filamento intermedio específico de los astrocitos. Comenzando poco después de la maduración, la expresión de GFAP aumenta progresivamente durante el envejecimiento. También es ampliamente utilizado como marcador de neurodegeneración.

En los cerebros de los mamíferos, los astrocitos representan el tipo de células más abundante y representan aproximadamente el 20% ~ 40% del número total de las células cerebrales. Comparado con astrocitos de roedores, los astrocitos protoplásmicos humanos se encuentran ~ 2.5 veces más grande en diámetro, ~ 16.5 veces más grande en volumen, (Oberheim Na, y col., 2009) y aumento de 10 veces en el número de procesos positivos para GFAP (glial fibrillary acid protein) que son radial y simétricamente en todas las direcciones desde el soma (Oberheim NA, y col., 2006). Además, hay un tipo de glía, con varios procesos no ramificados llamados astrocitos de proyección varicosa que existe sólo en cerebro humano (Oberheim Na, y col., 2009).

Durante muchos años se consideró que los astrocitos eran importantes, pero partidarios pasivos de las neuronas, proporcionando apoyo metabólico, precursores de neurotransmisores. La investigación demostró que la ablación de astrocitos in vivo o cultivando neuronas sin astrocitos resultó en la degeneración neuronal y finalmente la muerte (Allen NJ., 2014; Jäkel S, y col., 2017). Experimentos utilizando cultivos neuronales puros, que se cultivaron en condiciones que les permitan sobrevivir en ausencia de astrocitos (Meyer-Franke A y col. 1995; Ullian EM y col., 2001), demostró que los astrocitos pueden promover activamente la formación de sinapsis neuronales nacientes. Estudios posteriores usando tanto enfoque in vitro e in vivo descubrieron que los astrocitos también regulan el mantenimiento de la sinapsis y promueven la eliminación de la sinapsis, regulando así la arquitectura general y la actividad de circuitos neuronales y, en última instancia, el comportamiento animal.

Los astrocitos regulan las sinapsis por contacto directo (Nishida H y col., 2007; Stogsdill JA y col, 2017), y al secretar factores solubles que se dirigen a sitios pre y postsinápticos, modulan

así la estructura y función de las sinapsis excitatorias e inhibitorias (Ullian EM y col., 2001; Christopherson KS, y col., 2005; Mauch D. H. y col., 2001). Esto condujo al concepto de “sinapsis tripartita”, una sinapsis compuesta por dos neuronas y un astrocito como unidad funcional (Araque A., y col., 1999) y fue definida como la proximidad de los procesos astrocíticos a elementos neuronales presinápticos y postsinápticos (Auld DS, y col., 2003). En una sinapsis tripartita, los neurotransmisores liberados de las neuronas también se unen a los receptores en el proceso de astrocito adyacente, activando vías de señalización en los astrocitos que modulan el comportamiento sináptico (Araque A., y col., 1999; Papouin T. , y col., 2017). Se ha demostrado que los astrocitos regulan la estabilidad, la dinámica y la maduración de las espinas dendríticas (Haber M, y col., 2006; Nishida H, y col., 2007) y también participan en la regulación de la plasticidad y la transmisión sináptica (Ullian EM, y col., 2001). Este posicionamiento estratégico de los astrocitos permite que se produzca un diálogo interactivo entre estos dos tipos de células, que es fundamental para la comunicación local y generalizada de información a través del cerebro. Además de estar en contacto con las neuronas, los astrocitos están interconectados entre sí por uniones comunicantes, canales especializados que permiten que los nutrientes e iones difundan entre redes de astrocitos, ampliando aún más el rango y la magnitud de la sináptica y la regulación de las neuronas por los astrocitos (Pannasch U, y col., 2013).

Capítulo 1

2.1 Hipótesis

El envejecimiento del hipocampo conduce a una disminución en la neurogénesis adulta a partir de la mediana edad (MA) en las ratas hembra de la cepa SD lo que provoca un déficit en la memoria de separación de patrones.

2.1.1 OBJETIVO GENERAL

Nuestro grupo de investigación tiene una larga trayectoria en el estudio de la rata hembra senil (24 meses de edad) de la cepa Sprague-Dawley como modelo de envejecimiento espontáneo con la edad. Resultados previos de nuestro laboratorio sobre el envejecimiento del hipocampo demostraron que hay una disminución en la neurogénesis en las ratas viejas y un aumento de la neuroinflamación (Morel y col., 2015). Basándonos en estos estudios, para revertir los cambios asociados al envejecimiento realizamos terapia génica con un vector adenoviral que expresa el factor de crecimiento insulino-símil tipo 1 (IGF-I) en el cerebro de la rata vieja demostrando una mejora en la memoria espacial y en ciertos marcadores neurales que evidencian neurogénesis y neuroinflamación (Pardo y col., 2016)

En esta tesis se apunta a la caracterización comportamental y cognitiva de la rata hembra Sprague Dawley de mediana edad (MA, de sus siglas en inglés *middle-aged*; 12-18 meses) para poder evaluar cuáles cambios ocurren en el hipocampo antes que los animales lleguen a la vejez

(24 meses). Estos datos nos servirán para expandir los estudios previos de terapia génica con IGF-I realizados en la rata senil (Pardo y col., 2016). La importancia de caracterizar a la rata hembra SD de MA radica en poder contar con un modelo de envejecimiento temprano del hipocampo acompañado con un deterioro cognitivo. Este modelo nos traería grandes ventajas frente a las ratas viejas (24 meses); entre ellos cabe destacar una disminución de costos de mantenimiento y manipulación de los animales, así como también una reducción muy importante en el tiempo de trabajo. Para ello, hemos planteado los siguientes objetivos específicos a ser evaluados en nuestro modelo de rata MA.

2.1.2 Objetivos específicos

1. Analizar el *status* mnemónico en la rata MA para evaluar la memoria de referencia utilizando el Laberinto de Barnes que mide memoria espacial.
2. Analizar la capacidad exploratoria en la rata MA para determinar si existe un déficit no inherente a lo cognitivo.
3. Analizar el *status* mnemónico en la rata MA para evaluar su capacidad de la separación de patrones en un test de reconocimiento de objetos, teniendo en cuenta que, en este caso, la novedad es la nueva ubicación espacial del objeto.
4. Analizar morfométricamente los hipocampos de las ratas MA para evidenciar la neurogénesis adulta mediante inmunohistoquímica para DCX, un marcador de neuroblastos, y así compararlo con los cerebros de ratas jóvenes y seniles.

3.1 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.1. Animales.

En nuestro laboratorio, contamos con la rata hembra senil de la cepa Sprague Dawley (SD) como modelo de envejecimiento cerebral. Estos animales viven típicamente hasta los 34-36 meses de edad y su vida reproductiva cesa a los 9-10 meses (Rodríguez y col. 2013).

Se utilizaron ratas jóvenes, adultas y maduras post-reproductivas, de la cepa Sprague Dawley (SD), las cuales fueron obtenidas del bioterio del INIBIOLP. Fueron crecidas y mantenidas en condiciones estándar, en un ambiente controlado a una temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ y con ciclo de luz-oscuridad de 12 hs. Fueron alimentadas con alimento balanceado y agua acidificada, ambas administradas ad libitum. Al momento del ingreso en el estudio, a cada animal le fue asignado un número (según el experimento) e identificado mediante un patrón de marcas en la cola.

Todos los experimentos con animales se realizaron siguiendo las Pautas de Bienestar Animal del Comité Institucional para el Cuidado y el Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL). La aceptabilidad ética de nuestros protocolos con animales fue aprobada por el CICUAL de la Facultad de Ciencias Médicas, UNLP (P02-01-2017).

3.1.2. Evaluaciones comportamentales para evaluar la actividad exploratoria y el estatus mnemónico de la rata MA.-

Laberinto de Barnes: Una herramienta para el estudio de la memoria espacial en roedores.

El laberinto de Barnes consiste en una plataforma circular de 122 cm de diámetro de acrílico negro, elevada 90 cm del suelo, posee en la periferia 20 orificios de 10 cm de diámetro. Los agujeros son de diámetro uniforme (10 cm), pero solo un agujero se conecta a una caja de escape negra (túnel) que se coloca por debajo de la plataforma al nivel del agujero seleccionado. La caja de escape es de 38,7 cm de largo x 12,1 cm de ancho x 14,2 cm en profundidad y es extraíble.

Una caja cilíndrica blanca de color opaco abierta en una de sus caras de 30 cm de diámetro x 20 cm de altura se utiliza para colocar las ratas en la plataforma. Para que los animales se orienten se colocan señales visuales en las paredes de la sala, a 50 cm lejos de la plataforma. El agujero de escape se denominó número 0 para la representación gráfica normalizada mientras que los orificios restantes están numerados del 1 al 10 en el sentido de las agujas del reloj, y de -1 a -9 en sentido contrario (figura 15). El Agujero 0 permaneció en una posición fija, relativa a las señales. Durante las pruebas la plataforma se hizo girar diariamente. Se utilizó un generador de ruido blanco de 90 dB para que el animal no tenga más estímulos del medio externo, y una lámpara de 500 W de luz blanca que proporcionan el estímulo de escape de la plataforma. Los comportamientos se registraron utilizando una cámara de vídeo conectada a computadora montada 110 cm arriba la plataforma. (Vargas-Lopez y col., 2011). Las actuaciones grabadas en vídeo de los sujetos fueron medidas usando el Kinovea v0.7.6 (<http://www.kinovea.org>) y Image Pro Plus v5.1 (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MD, EE.UU.).



Figura 15. En el presente estudio se utilizó el diseño Barnes Maze. El laberinto consiste en una plataforma circular de acrílico negro, de 122 cm de diámetro, conteniendo veinte agujeros alrededor de la periferia. Los agujeros son de apariencia y diámetro uniforme (10 cm), pero sólo un agujero es conectado a una caja negra de escape.

Prueba de Campo Abierto: una herramienta para evaluar actividad exploratoria

La prueba de campo abierto (open field test, OFT) consta de una plataforma cuadrada de color negro (65cmx65cmx45cm), iluminada con una fuente de luz (60W) (Fedotova et al. 2004). El piso de la caja se encuentra dividido en 16 cuadrados iguales de 16 cm x 16 cm. Los comportamientos se registraron utilizando una cámara de vídeo conectada a computadora montada 110 cm arriba la plataforma. Las actuaciones grabadas en vídeo de los sujetos fueron medidas usando el Kinovea v0.7.6 (<http://www.kinovea.org>) y Image Pro Plus v5.1 (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MD, EE.UU.). El test OF proporciona medidas simultáneas de locomoción, exploración y ansiedad. (Walsh, R. N. & Cummins, R. A, 1976). Esta herramienta sirve para medir el estado general del animal.

Prueba de reconocimiento espontáneo de la novedad: una herramienta para medir la memoria de separación de patrones

La separación de patrones se define como el proceso mediante el cual se pueden distinguir diferentes memorias solapadas que fueron adquiridas de contextos parecidos (Colgin y col., 2008; Wilson, 2009). Este ensayo consiste en una fase de presentación de los objetos y una fase de elección del objeto. Para ello utilizamos el dispositivo que se emplea para realizar el OFT descrito en la sección anterior. Los objetos utilizados fueron botellas idénticas de refresco de 200cc, las cuales se les eliminó las etiquetas y se las pintó con pintura inocua del mismo color y se les puso peso (arena) para que no se puedan caer en caso que los animales tengan contacto con los objetos. Los comportamientos se registraron utilizando una cámara de vídeo conectada a computadora montada 110 cm arriba la plataforma. Las sesiones fueron grabadas en vídeo usando el software gratuito Kinovea v0.7.6 (<http://www.kinovea.org>) y Image Pro Plus v5.1 (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MD, EE.UU.).

3.1.3. Diseño experimental

Se utilizaron ratas hembra de mediana edad (MA) de 12-13 meses de edad y ratas hembra jóvenes de 2-3 meses de edad. Contamos también con un lote control de ratas seniles de 28 meses de edad.

Experimento 1: El laberinto de Barnes para la evaluación de la memoria espacial en ratas MA

Se utilizó una muestra de 5 ratas jóvenes de 2 meses de edad como control, y 5 ratas de MA de 12 meses de edad. Para evaluar la fase de retención de las ratas MA, se utilizó el laberinto de Barnes (Barnes 1979).

El Barnes clásico consiste en 5 días de ensayos de adquisición (ATs) (4 ensayos por día de 120 s).

Implica tres fases: *habitación*, *entrenamiento* (ensayos de adquisición) y *prueba*. Consiste en una plataforma circular de acrílico negro elevada (108 cm en el suelo), de 122 cm de diámetro, la cual contiene 20 agujeros alrededor de la periferia. Los agujeros tienen un diámetro uniforme de (10cm) y solo uno de ellos está conectado a una caja de escape negra. La caja de escape posee 38.7 cm de largo x 12,1 cm de ancho x 14.2 cm de profundidad y es removible. Se utiliza una cámara cilíndrica blanca de partida (opaca y abierta, de 25 cm de diámetro y 20 cm de altura) para colocar las ratas en el centro de la plataforma. Se colocan en la sala cuatro señales visuales, a 50 cm de distancia de la plataforma circular. El orificio de escape se numera como agujero 0 para fines de representación gráfica, mientras que los agujeros restantes están numerados de 1 al 10 en el sentido de las agujas del reloj y de -1 a -9 en el sentido antihorario.

Durante todo el experimento, el agujero 0 permaneció en un lugar fijo para evitar la aleatorización de la posición relativa de la caja de escape. Se utilizó un generador de ruido blanco de 90 dB y una bombilla de luz blanca de 500 W proporcionaron los estímulos de escape de la plataforma. Al comienzo del experimento, las ratas se habitúan al test. La rutina de habituación consiste en colocar los animales en cada compartimento durante 120s (cilindro de inicio y caja de escape). Un AT consiste en colocar una rata en el cilindro de inicio, ubicado en el centro de la plataforma durante 30s, a continuación, el cilindro se remueve, los estímulos aversivos (luz y ruido intenso) se encienden y la rata explora libremente el laberinto durante 120s. El objetivo de AT es entrenar a los animales para encontrar el agujero de escape. Una vez que se iniciaron los AT, las ratas fueron entrenadas con la caja de escape, cuatro veces al día durante cinco días, dando un total de 20 entrenamientos (días experimentales 1-5). El día 6 las ratas fueron sometidas a una primera prueba sin caja (PT1) durante 120 segundos. Después, las ratas tuvieron un reposo de 4 días (días 7 a 10) y el día 11 se sometieron a un segundo ensayo (PT2). Un PT es similar al AT, pero excepto que se elimina la caja de escape. Su propósito es evaluar la retención de la memoria espacial reciente. Durante el PT, las ratas exploran el laberinto durante 120s. Las superficies del laberinto, el cilindro de inicio y la caja de escape se limpiaron con etanol al 10% después de cada prueba para eliminar las señales

olfativas. Se registró el rendimiento conductual utilizando una cámara de video conectada a una computadora montada de 110 cm por encima de la plataforma. (Figura 16).

Los parámetros de comportamiento evaluados fueron los siguientes:

- A) **Latencia de la caja de escape:** tiempo (en seg) que pasa un animal desde su lanzamiento desde la cámara de inicio hasta que entra en la caja de escape (durante un AT) o hasta la primera exploración del orificio de escape (durante un PT).
- B) **Errores.** La exploración de un agujero incorrecto se cuenta como un error, esto ocurre cuando la rata baja su nariz debajo del plano de la superficie de la mesa.
- C) **Actividad exploratoria total:** la suma de todas las exploraciones de una rata en el primer AT. Este parámetro representa la actividad exploratoria inespecífica de las ratas (antes de darse cuenta de la presencia de una caja de escape).
- D) **Frecuencia de exploración del sector meta** (Goal Sector, GS): la suma del número de exploraciones de los agujeros -1,0, 1 dividido por 3 (GS3) o el número de exploraciones del agujero 0 (GS1), durante un PT.

El día anterior al primer ensayo las ratas se sometieron a una rutina de habituación para que conozcan la plataforma y la caja de escape. Un ensayo de adquisición (AT) consiste en colocar una rata en la cámara de inicio, ubicada en el centro de la plataforma durante 30 s; luego se levanta la cámara, los estímulos aversivos (luz brillante y ruido de tono alto) son encendido, y la rata puede explorar libremente el laberinto durante 120 s. El propósito de los AT es entrenar a las ratas para encontrar el agujero de escape.

Con el fin de eliminar las pistas olfativas del laberinto y las cajas, las superficies se limpiaron con Solución alcohólica etílica al 10% después de cada ensayo.

Protocolo A Laberinto de Barnes

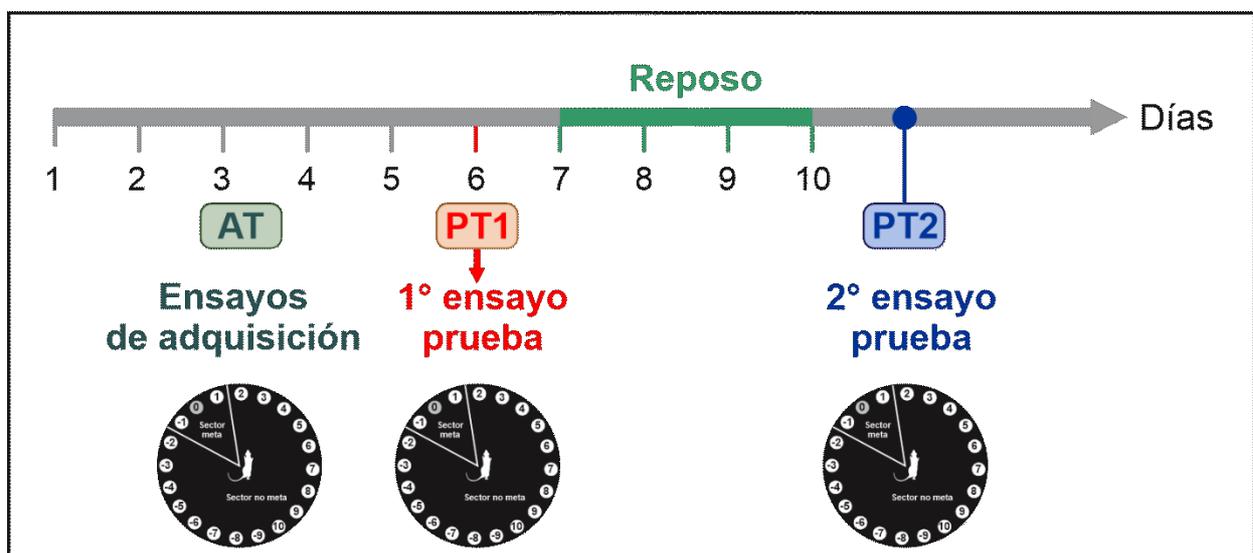


Figura 16: Diseño experimental del laberinto de Barnes teniendo en cuenta los Ensayos de adquisición con una duración de 5 días, al siguiente día se realizó el probe trial o ensayo de prueba. Luego se los dejó reposar unos 4 días y por último se realizó el segundo Probe trial.

Experimento 2: Evaluación de la actividad exploratoria y la memoria de separación de patrones en ratas MA utilizando una prueba de reconocimiento espontáneo de la novedad.

El experimento fue llevado a cabo en 5 días, 3 días de habituación donde se midió la actividad exploratoria, en el día 4, la fase de presentación de los objetos y en el día 5 la prueba de reconocimiento espontáneo de la novedad (Figura 17) donde se evaluó la memoria de separación de patrones.

Se utilizaron 4 ratas jóvenes de 4 meses de edad y 4 ratas MA (12 meses de edad), las cuales se llevaron en sus cajas habitación a la sala de pruebas. Se dejó que las ratas se aclimataron a la sala de procedimientos durante un mínimo de 30 minutos antes de comenzar la prueba.

La habituación se inicia cuando se coloca una rata en el centro de la arena, que consiste en un laberinto cuadrado de 65x65cm con paredes de 45 cm.

En la fase de habituación, se permitió el movimiento libre e ininterrumpido de la rata durante un único período de 10 minutos, sin la presencia de objetos.

Este procedimiento se realizó en tres días consecutivos.

Los parámetros a determinar son los siguientes:

- **Cruzamiento (crossing):** Número de cuadrados que el animal atraviesa, considerando este parámetro cuando el animal cruza de un cuadrado a otro con sus patas traseras.
- **Frecuencia de erguirse (frequency of rearing):** Tiempo en el cual el animal permanece en posición vertical respecto del piso de la caja.
- **Frecuencia de acicalamiento (frequency of grooming):** Tiempo que el animal invierte en el aseo de nariz, cara y cabeza (movimientos sobre la parte superior de la cabeza y detrás de las orejas) utilizando sus patas delanteras y también mediante lamidos en el resto del cuerpo (Kalueff and Tuohimaa, 2005).
- **Entradas al área central:** Tiempo que la rata se encuentra en el cuadrante central de la arena con sus cuatro patas.

En la fase de presentación se expone a los animales durante 10 minutos a tres objetos idénticos ubicados a 30 cm de separación y a 15 cm de la pared más próxima. (consistiendo en botellas de plástico de 250 cm³, teñidas de diferentes colores, rellenas de arena para darles peso).

Cabe destacar que, en lugar de cambiar un objeto en la segunda prueba, un objeto se mantiene en el mismo lugar, otro de los objetos se elimina, y el otro se mueve, a lo largo de una línea recta en diagonal, a una distancia adyacente a la posición anterior. Roedores con la separación de patrones deteriorada no reconocerá esta nueva posición, mientras que los roedores con patrón de separación intacto reconocerán que el objeto ha sido movido.

En la fase de elección, se presentan sólo dos objetos durante 5 minutos, uno queda en una posición familiar y otro en una nueva posición de 15 cm ligeramente alejada de la ubicación original, ahora la separación de los objetos a una distancia de 45 cm.

Los parámetros utilizados para contabilizar la preferencia por un objeto fueron:

- Frecuencia de la interacción entre los objetos
- Tiempo dedicado a explorar cada objeto.

Días experimentales

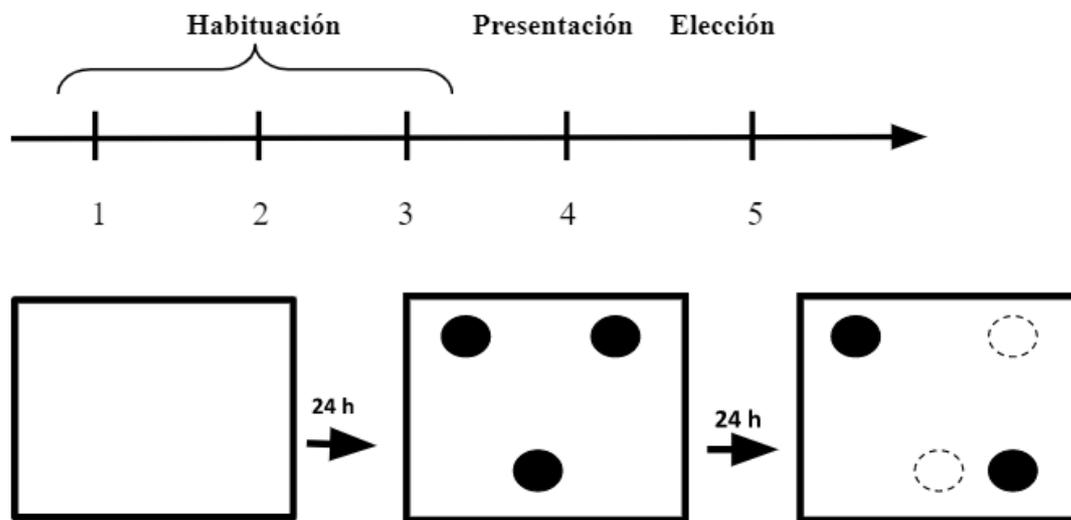


Figura 17. Diseño experimental de la prueba de reconocimiento espontáneo de la novedad. En los días 1,2 y 3 se llevó a cabo el OFT y en los días 4 y 5 la prueba para evaluar la memoria de separación de patrones. Los círculos negros representan los objetos y los círculos con líneas de puntos representan la ubicación anterior de los objetos.

Antes del uso y antes de las pruebas posteriores la cámara fue limpiada minuciosamente con una solución de etanol al 95% para eliminar cualquier pista de olor dejada por la rata anterior. El comportamiento fue registrado utilizando una cámara de vídeo conectada a computadora montada 110 cm arriba la plataforma. Las actuaciones grabadas en vídeo de los sujetos fueron medidas usando el Kinovea v0.7.6 (<http://www.kinovea.org>) y Image Pro Plus v5.1 (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MD, EE.UU.)

Al finalizar el experimento, las ratas fueron sacrificadas según los protocolos anteriormente descritos y los cerebros perfundidos se reservaron a -20C para su posterior procesamiento, corte y análisis inmunohistoquímico. Se llevó a cabo la marcación con DCX+ a fin de contabilizar el número de neuroblastos, de manera tal de contar con el análisis del nivel de neurogénesis en cada uno de los tres grupos etarios.

3.1.4. Eutanasia y disección de cerebros

Al final del experimento se procedió a la eutanasia de los animales. Fueron colocados bajo anestesia profunda con ketamina (40 mg/kg de PC; im) y se procedió a la perfusión intracardiaca. Para acceder al corazón, se efectuó una incisión a la altura del esternón, se cortaron el diafragma y las costillas en la unión costochondral, retirando la región con la tijera diente de ratón. Una vez expuesto el corazón, se cánula la arteria aorta a través del ventrículo izquierdo con una aguja de punta roma. Inmediatamente después, se efectuó un pequeño corte en la aurícula derecha para permitir el drenaje del sistema vascular al final del circuito. Se perfunde a una velocidad de 13 ml/min con una bomba de perfusión peristáltica (Gilson modelo MP312), Primero pasando 200 ml de buffer fosfato (PB, 0.01M) y luego 200 ml de paraformaldehído (PFA) al 4% (pH 7,4). Subsecuentemente, los animales se decapitaron con una guillotina, los cerebros se extrajeron cuidadosamente y se almacenaron en PFA al 4% durante toda la noche a 4C. Luego los cerebros, fueron conservados en solución criopreservadora (30% de etilenglicol, 1% de polivinilpirronilona, 30% de sacarosa, en PB 0.1M, pH 7.4) a -20C hasta su uso en IHQ. Para ello, se cortaron coronalmente en secciones de 40 um con vibratomo (VT10005; Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) y 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 (con una separación de 240 um).

3.1.5. Inmunohistoquímica de cerebro (IHQ)

Análisis de neuroblastos

En cada animal, una de cada 6 secciones contiguas del hipocampo fue seleccionada para obtener un grupo de secciones seriadas no-contiguas, las que fueron procesadas por IHQ usando anticuerpos comerciales anti-DCX (doble cortina) para el marcado de neuroblastos. En cada bloque hipocampal, una de cada seis secciones seriadas fue seleccionada con el fin de obtener un conjunto de secciones no contiguas en serie que abarcan el hipocampo dorsal. Por lo general, un hipocampo dorsal completo comprende aproximadamente 66 secciones coronales, lo que produce seis conjuntos de secciones en serie no contiguas (240 um de separación). Se evaluó el número de células en el hipocampo dorsal que está ubicado entre las coordenadas 2.8 mm a 4.5 mm desde el bregma (Paxinos y Watson, 1998) utilizando un Microscopio Olympus BX-51, a 500 aumentos, conectado a una videocámara Olympus DP70 CCD (Tokio, Japón). Las células se contaron en seis secciones emparejadas por animal. El número total de celdas se estimó utilizando una versión modificada del método del disector óptico (West, 1993). Se calculó el número de neuroblastos (N) para cada región de acuerdo con la siguiente fórmula: $N = RQR \cdot 1/ssf \cdot 1/asf \cdot 1/tsf$, donde RQR es la suma estimada de neuroblastos contados, 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. Células en el plano focal superior y/o intersección de los límites de exclusión del marco de conteo no fueron contados. En todos los casos, ssf fue igual a 1/6 y tsf era igual a 1.

Cabe señalar que los animales que no fueron perfundidos de manera correcta fueron descartados del análisis.

Para este momento se cuenta también con un grupo de ratas seniles (n=4) del mismo lote original, es decir que las ratas de 12 meses que consideramos MA para los protocolos comportamentales se dejaron crecer en bioterio bajo las mismas condiciones que las anteriores, hasta llegar a la edad final de 24 meses.

3.1.6. Análisis de imágenes

Las imágenes de las regiones de interés fueron adquiridas con una cámara fotográfica digital (DP70, Olympus) acoplada a un microscopio de fluorescencia (Olympus BX51). El análisis de imágenes será realizado usando el programa Image Pro Plus v5.2. La evaluación estereológica de las estructuras cerebrales de interés se realizó utilizando una variante simplificada del método del fraccionador óptico (Tfilin M, y col., 2010).

3.1.7. Análisis estadístico

Los datos fueron recopilados y analizados con Sigma Plot v. 11 software (San José, CA, EE. UU.). Para evaluar la actividad exploratoria y separación de patrones con los parámetros: crossing se utilizó t-test y Mann-Whitney, para rearing se usó t-test y para grooming t-test y Mann-Whitney.

Las medidas conductuales por ensayo se agruparon para comparaciones intra-grupo utilizando análisis de varianza de medidas repetidas (RM ANOVA). Los niveles de significación se establecieron en $P < 0,01$. Se utilizó también el análisis t-test y un test no paramétrico Mann-Whitney. Tanto para la prueba de reconocimiento espontáneo de la novedad como para la fase de selección se utilizó ANOVA de una vía,

Para el comportamiento y los datos estereológicos se presentan como media \pm SEM. Para el análisis morfométrico se utilizó ANOVA de una vía. Los criterios para diferencias significativas se fijaron en el nivel de probabilidad del 99%.

4.1 RESULTADOS

4.1.1 Objetivo 1

Experimento 1: Evaluación de la memoria espacial en el Laberinto Barnes

A partir del día experimental 2, la **latencia** al agujero de escape cayó rápidamente tanto en los jóvenes como en las ratas MA. Se utilizó RM ANOVA de dos vías. A partir de los días 2 al 5, se observó que los animales jóvenes y los de MA mostraron un mejor rendimiento en el momento de alcanzar el agujero de escape no habiendo una diferencia significativa entre los dos grupos ($P=0.878$) (Figura 18).

Latencia Entrenamiento

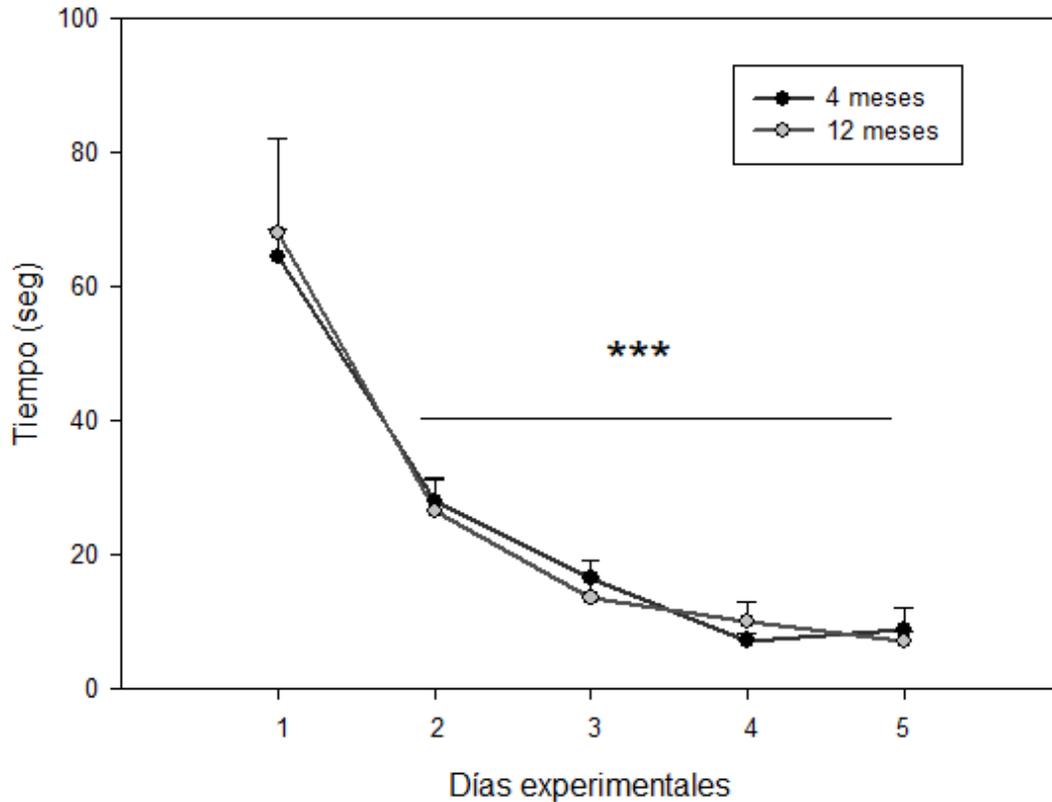


Figura 18. Latencia en el entrenamiento. En este gráfico de líneas y puntos se observó que no hay diferencias entre las ratas jóvenes y las ratas de mediana edad en encontrar el agujero de escape.

A partir del día experimental 2, los **errores** disminuyeron tanto en las ratas jóvenes como en las de MA (RM ANOVA de dos vías). Además, hacia el final de los entrenamientos se observó que los animales jóvenes y los de mediana edad mostraron un mejor rendimiento en el momento de alcanzar el agujero de escape no habiendo una diferencia significativa entre los dos grupos. ($P=0.936$), pero si hay una diferencia significativa en relación a los días con un ($P=0.008$). Figura 19).

Errores Entrenamiento

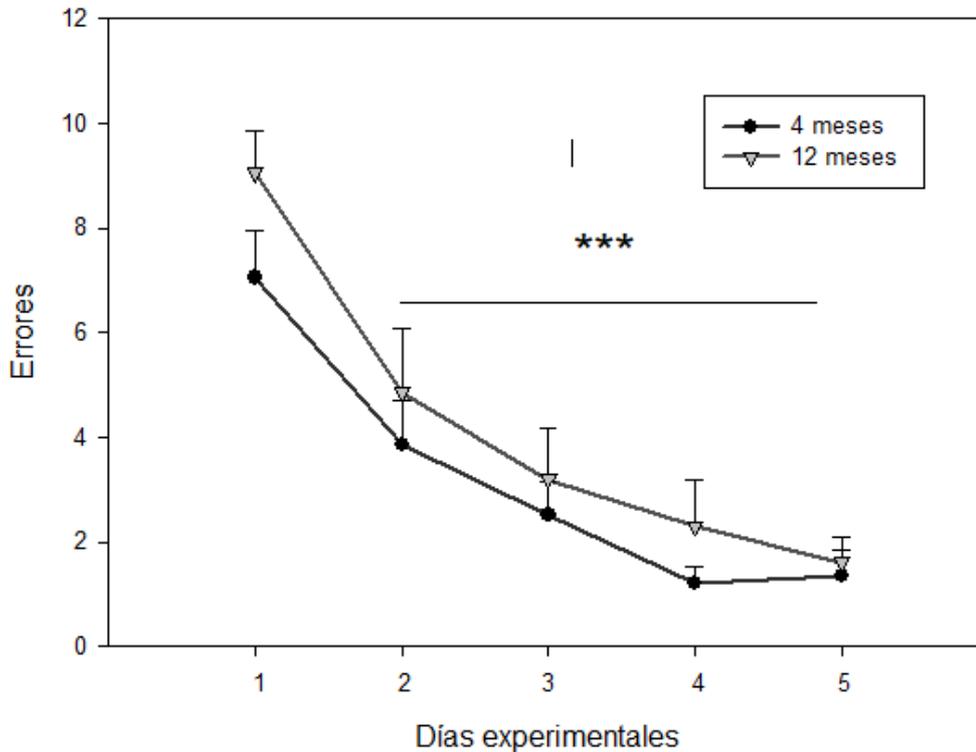
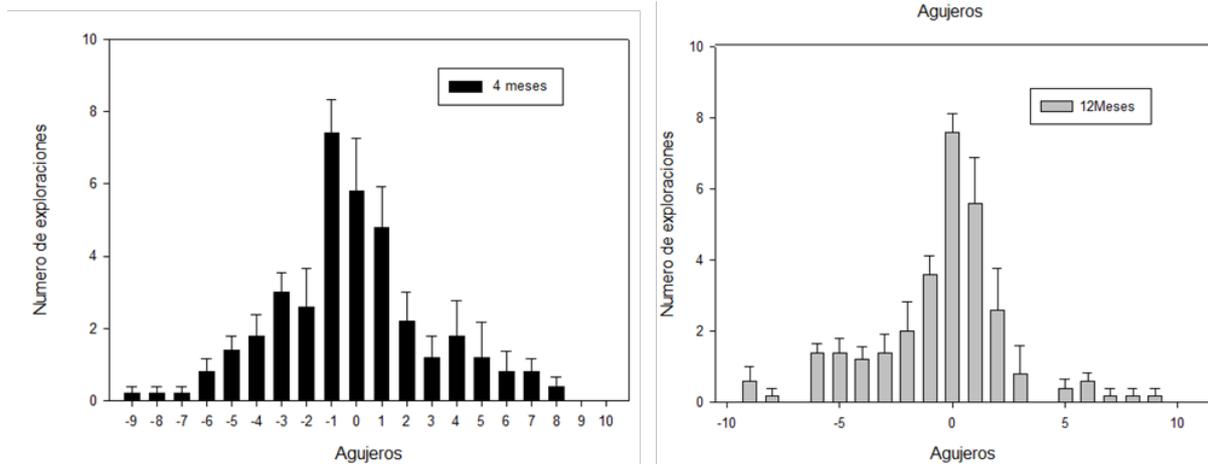


Figura 19. Errores en el entrenamiento. En este gráfico de líneas se observó que a partir del día 2 comienza a disminuir los errores a agujero meta tanto en las ratas jóvenes como en las de mediana edad.

4.1.2 Objetivo 2

La frecuencia de exploración de agujeros mostró una distribución en forma de campana alrededor del agujero # 0 en PT1 en los dos grupos de edad. Se utilizó RM ANOVA de dos vías, $P=0.174$ no encontrándose diferencias significativas entre los dos grupos de edades. Sin embargo, observando el gráfico a medida que aumenta la edad de los animales hay una fluctuación en las frecuencias dentro de la campana. En PT2 la frecuencia de exploración de agujeros también mostró una distribución en forma de campana alrededor del agujero # 0, pero la forma de la campana se encontró menos definida que en PT1 particularmente para el grupo de mediana edad. En PT2 la curva para las ratas de mediana edad conserva poca semejanza con una campana no habiendo una diferencia significativa en la exploración de los agujeros RM ANOVA de dos vías (figura 16). ($P=0.176$) (Figura 20).

Número de exploraciones PT1



Número de exploraciones PT2

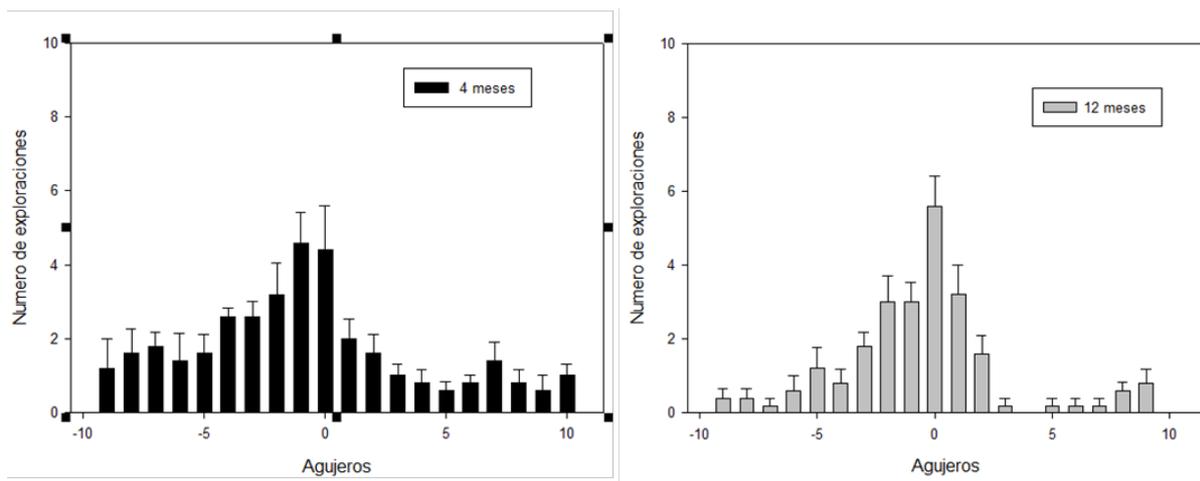


Figura 20. Número de exploraciones para probe trial 1 y probe trial 2. En estos gráficos de barras se observaron en forma de campana como tanto las ratas jóvenes como las ratas de mediana edad exploraron más el agujero meta que los demás agujeros lejanos a éste.

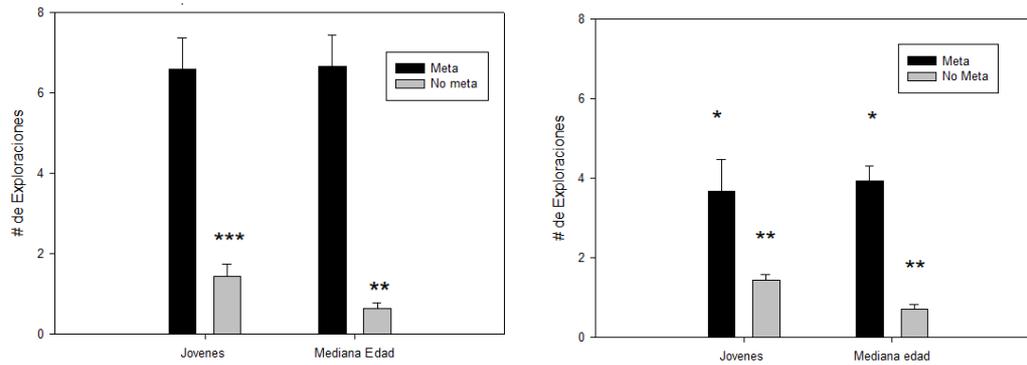


Figura 21. Frecuencia de exploración del sector meta. En este gráfico de la izquierda PT1, se observa que hay diferencias significativas, ya que tanto las ratas jóvenes (6 meses) como las de mediana edad (12 meses) exploran más la región meta (agujeros -1, 0 y 1), ($P=0.08$). En PT2, gráfico de la derecha se evidencia que hay diferencias significativas en las ratas jóvenes con un ($P=0.027$), mientras que en las ratas MA no se evidenciaron diferencias significativas.

4.1.3. Objetivo 3

Experimento 2: Evaluación de la memoria de separación de patrones utilizando una prueba de reconocimiento espontáneo de la novedad

El experimento fue llevado a cabo en 5 días, 3 días de habituación donde se midió la actividad exploratoria en el OFT sin los objetos, y los días 4 y 5 la prueba de reconocimiento espontáneo de la novedad (figura 17).

En el OFT (días 1, 2 y 3) uno de los parámetros de comportamiento que se observó es **crossing** que se define como el número de cuadrados que el animal atraviesa, considerando este parámetro cuando el animal cruza de un cuadrado a otro con sus patas traseras. Se evidenció que en ninguna de las sesiones de habituación hay diferencias significativas entre los ensayos y entre las edades (t-test, $P=0.244$) para H1, (t-test, $P=0.395$) para H2 y para H3 se hizo Mann-Whitney. (Figura 22).

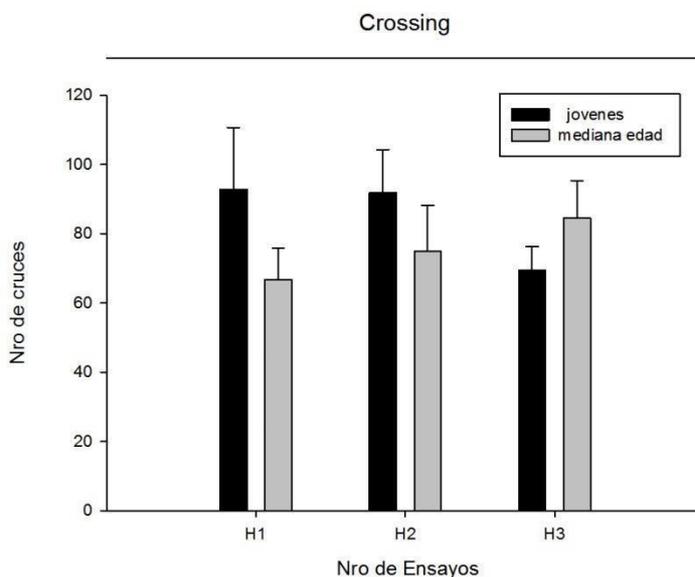


Figura 22. Crossing. En este gráfico de barras se observó que a lo largo de los entrenamientos no hay diferencias en el cruce de los cuadrados entre las ratas jóvenes y las de mediana edad.

Número de entradas al área central

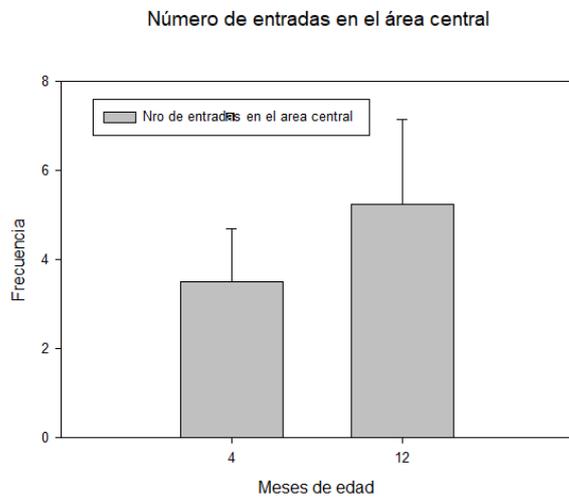


Figura 23. Números de entradas al área central. En este gráfico de barras se observó que tanto las ratas jóvenes como las de mediana edad no experimentaron diferencias significativas en el número de entradas al área central.

Teniendo en cuenta el parámetro de cantidad de veces que el animal entra al área central se observa que no existen diferencias significativas entre los dos grupos estudiados, ratas jóvenes y de mediana edad para un $t = 0,784$ con 6 grados de libertad ($P = 0,463$) y 95% de confianza. (Figura 23)

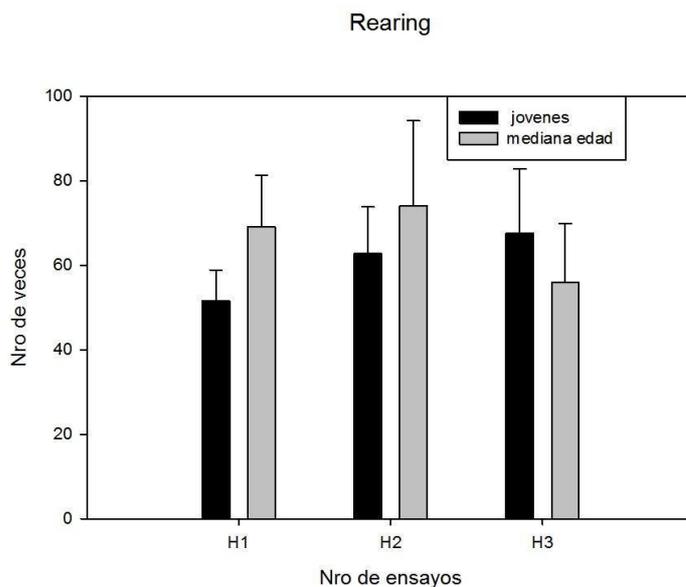


Figura 24. Frecuencia de Rearing. En este gráfico de barras se observó que a lo largo de los ensayos H1, H2 y H3, tanto las ratas jóvenes como las de mediana edad no experimentaron diferencias significativas en la cantidad de veces que se mantienen en posición vertical con sus patas traseras en relación a la plataforma.

Teniendo en cuenta el parámetro de **rearing** que se define como el tiempo en el cual el animal permanece en posición vertical respecto del piso de la caja se observó que no hay diferencias significativas entre los grupos de animales (jóvenes y mediana edad) y los ensayos. Esto se comprobó mediante t-test ($P = 0.265$) para H1, ($P = 0.640$) para H2 y ($P = 0.592$) para H3 (Figura 24).

Otros de los parámetros que se tuvo en cuenta en el experimento (OF) fue **grooming** (acicalamiento) que está definido como el tiempo que el animal invierte en el aseo de nariz, cara y cabeza utilizando sus patas delanteras y también mediante lamidos en el resto del cuerpo. Se observó que tanto en H1 como H2 y H3 hay un mayor acicalamiento por parte de las ratas jóvenes que de las de mediana edad. Para verificar este resultado se utilizó t-test en H1 y para H2 y H3 un test no paramétrico Mann-Whitney debido a que en el H2 falló el test de Normalidad y en H3 fallo la igualdad de Varianza. Se observó que hay diferencias significativas entre los grupos de ratas jóvenes y de mediana edad tanto en H1 ($P = 0.039$), como en H2 ($P = 0.029$) y H3 con ($P = 0.029$), (figura 25).

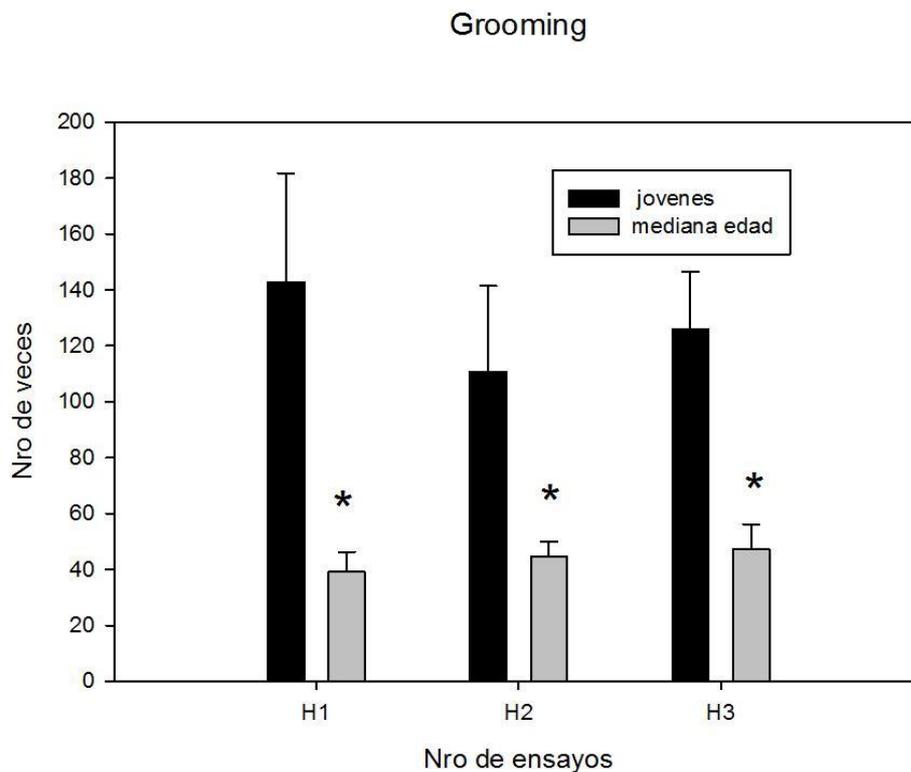


Figura 25. Grooming. En este gráfico de barras las ratas jóvenes se observaron que se acicalan más cantidad de veces que las ratas de mediana edad en los tres días de habituación. * $P < 0.05$ con respecto a las ratas jóvenes.

Seguidamente, en la prueba de reconocimiento espontáneo de la novedad (día experimental 4), en la fase de presentación de los tres objetos, tanto las ratas jóvenes como las ratas de mediana edad se observó que no hay diferencias significativas entre los grupos de edades con respecto a la exploración de los objetos utilizando el test de ANOVA de una vía con un ($P=0.793$) (Figura 26)

Fase de presentación

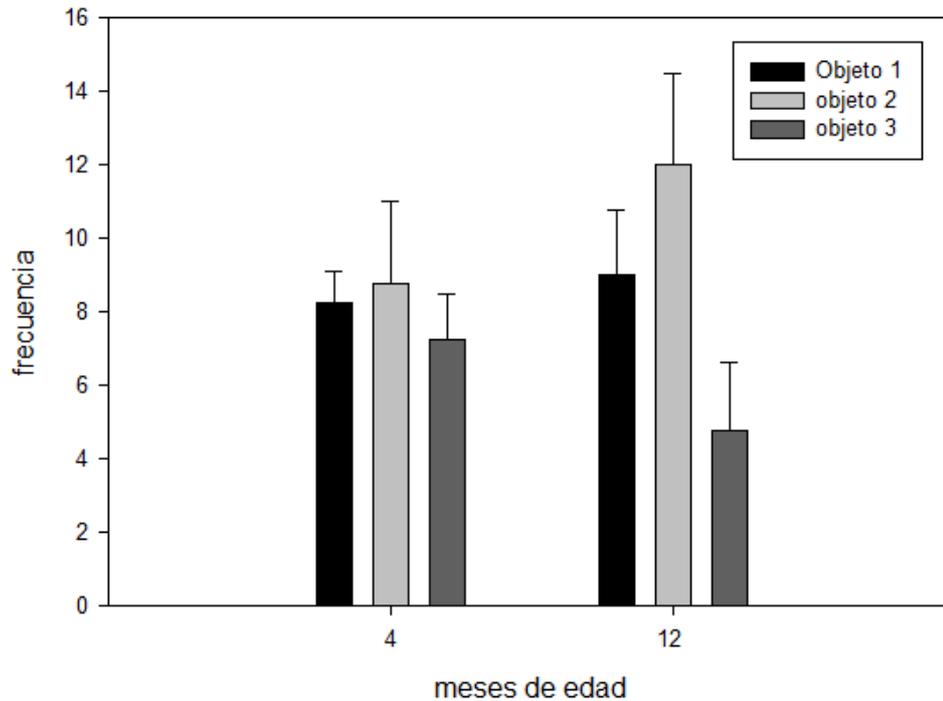


Figura 26. Fase de presentación. En este gráfico de barras se observó que no hay diferencias en la exploración de los objetos 1, 2 y 3 entre las ratas jóvenes de 4 meses y MA de 12 meses. El color de las barras corresponde a: (barra negra: Objeto 1, gris claro: Objeto 2, y gris oscuro al objeto 3). Los objetos 1 y 2 son objetos familiares mientras que el 3 es el nuevo.

En la fase de elección (día experimental 5), se observó que no hay diferencias significativas en la exploración del objeto nuevo (objeto 3) sobre los dos objetos familiares (objeto 1 y 2) en ambos grupos estudiados (ANOVA de una vía (objeto) $P=0,371$) (Figura 27).

Fase de selección

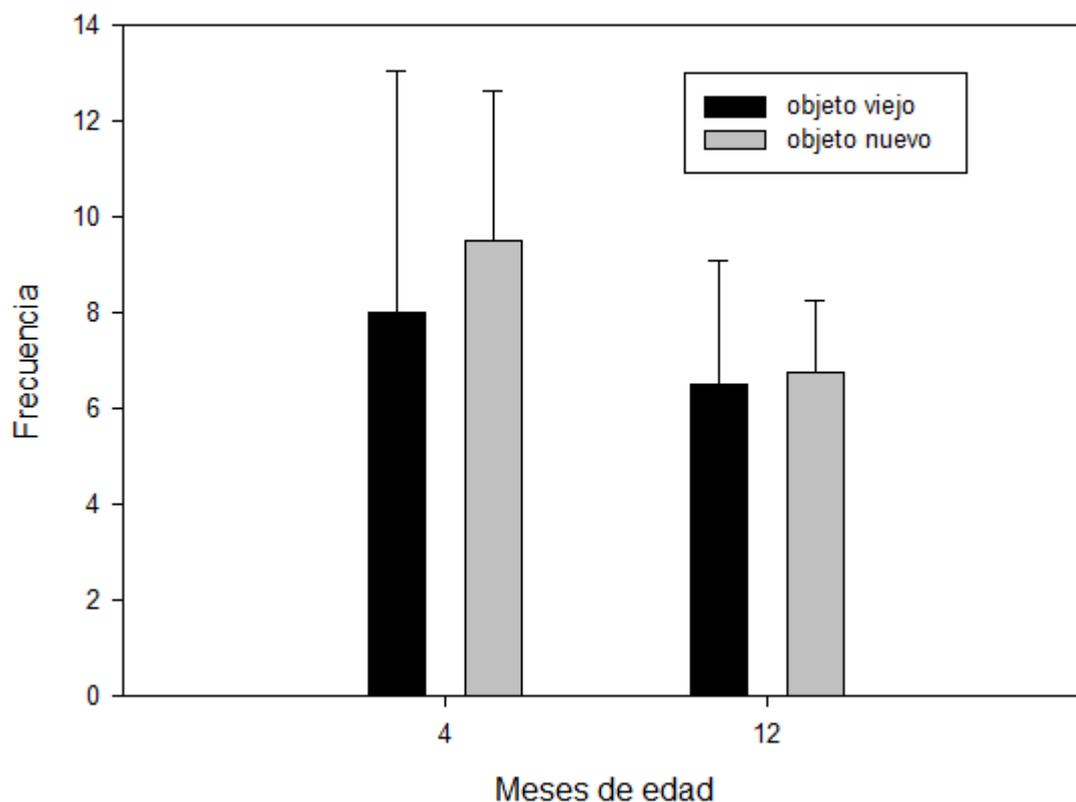


Figura 27. Fase de selección. En este gráfico de barras se observó que tanto las ratas jóvenes como de mediana edad exploran de forma similar todos los objetos presentados para tal ensayo, mostrando que no hay diferencias significativas entre los objetos nuevo y viejo.

4.1.4. Objetivo 4

Análisis morfométrico de los hipocampos de las ratas MA

Al finalizar el protocolo experimental, los animales se sacrificaron para perfundir los cerebros y llevar a cabo el análisis morfométrico de nuevas neuronas mediante la marcación inmunohistoquímica para doblecortina. En la figura 28 se representan los resultados obtenidos para el número de neuroblastos totales en ratas jóvenes (n=4), ratas MA (n=3) y ratas seniles (n=4). Podemos observar que las ratas MA muestran una disminución abrupta en el número de nuevas neuronas DCX positivas respecto al grupo joven, resultando similar al resultado obtenido en ratas seniles (no hay diferencia significativa entre estos dos grupos). El número de neuroblastos DCX+ en ratas MA como en ratas seniles, fue significativamente menor (Anova de una vía, $P < 0,001$) que en ratas control jóvenes. (Figura 28 a,b,c)

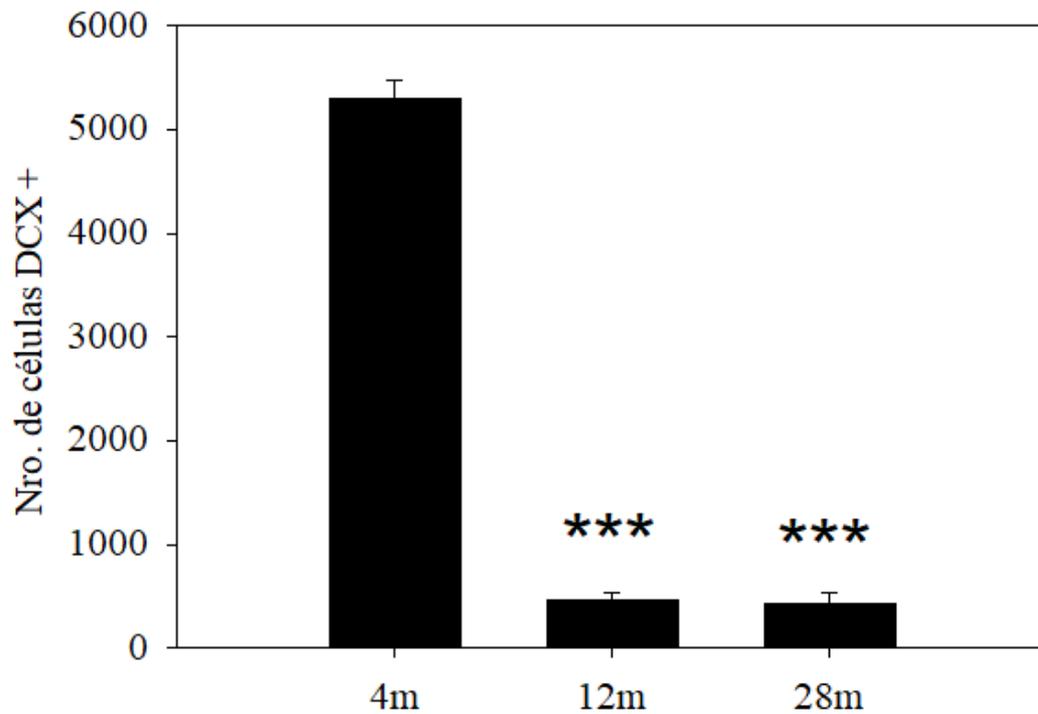
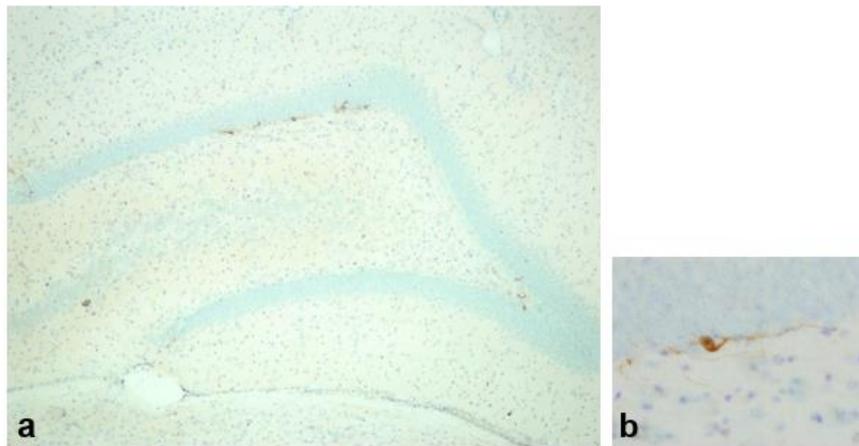


Figura 28: Microfotografía mostrando la neurogénesis de los neuroblastos en la región subgranular del giro dentado en el hipocampo de una rata de 12 meses de edad. La **figura b** muestra una magnificación de la foto anterior, mostrando un neuroblasto. **c Número de neuroblastos DCX+** en ratas jóvenes, MA y seniles, respectivamente. En este gráfico podemos observar una disminución significativa en la neurogénesis de ratas MA, comparado con su respectivo control joven. Lo mismo se observa para las ratas seniles de 28 meses de edad, como era esperado (***) $P < 0,001$).

5.1 Discusión

La rata de mediana edad como modelo de envejecimiento del hipocampo

Para nuestros estudios sobre envejecimiento cerebral, es preciso contar con un modelo animal que nos permita llevar a cabo experimentos de ciencia básica donde podamos evaluar el efecto del envejecimiento sobre el cerebro y el status mnemónico. Tanto en las ratas como en los humanos, el rendimiento del aprendizaje y la memoria disminuye con la edad, lo que hace que esta especie sea un modelo adecuado para evaluar tratamientos y estrategias de valor clínico potencial para restaurar los déficits cognitivos relacionados con la edad.

En este sentido, las ratas hembra SD han sido ampliamente utilizadas, ya que su manipulación es más sencilla, y los costos requeridos para su mantenimiento son mucho menores, observándose que el deterioro de la memoria espacial comienza a los 14 meses, con mayor deterioro a los 20-26 meses (Barret y col 2009), así como también una disminución de la estructura hipocampal sumamente relevante en los procesos cognitivos. Previamente en nuestro laboratorio se estudió que esta cepa de ratas tiene una disfunción de las neuronas dopaminérgicas del hipotálamo y eso genera que las ratas pierdan el control de la secreción de la prolactina por la adenohipófisis, desarrollando prolactinomas hipofisarias, lo que conlleva a niveles séricos elevados de prolactina y, en consecuencia, a la aparición de tumores mamarios. (Hereñu y col., 2007). Esta característica espontánea que presentaba esta cepa dió lugar a poder practicar diversas terapias génicas para paliar este aumento hormonal y se vió que servía para disminuir este nivel hormonal. Es por ello por lo que se fue ampliando el uso de tal cepa para otras tareas como estudiar si estas terapias génicas podrían también ayudar al deterioro cognitivo, ya que en USA estaba muy estudiada. En nuestro laboratorio se utilizan ratas hembra, ya que los machos ocupan más espacio, por ser más grandes de tamaño y se debería poner dos ejemplares por caja y eso también aumenta el costo de manutención, así como también poseer un mayor espacio físico para su crianza. Otras de las razones por las que se utilizó hembras en este estudio es que los machos son más agresivos que las hembras. Se sabe que estas últimas parecen ser más resistentes que los machos a los efectos del estrés sobre la memoria, y que ellas tienen mejor memoria espacial (Luine V y col. 2002). Otros datos podrían indicar que, en respuesta a un estrés adicional (como puede ser el sonido en el laberinto de Barnes), las ratas hembra muestran un mejor comportamiento que los machos.

Aunque nuestras ratas no fueron sometidas experimentalmente a protocolos de estrés, es importante mencionar que las hembras parecen ser más resistentes que los machos a los efectos del estrés crónico sobre la memoria, y que ellas tienen mejor memoria espacial (Luine V y col. 2002). Otros datos podrían indicar que, en respuesta a un estrés adicional (como puede ser el sonido en el laberinto de Barnes), las ratas hembra muestran un mejor comportamiento que los machos. (Luine V y col. 2002).

Aprendizaje y memoria espacial

Evaluación de la memoria espacial en ratas mediana edad en el laberinto de Barnes

La mayoría de los estudios con ratas sobre el impacto del envejecimiento y sobre la memoria espacial se han realizado en machos (algunos estudios relevantes son: Barnes y col., 1980; Frik y col., 1995; Barret y col, 2009; Bizon y col., 2009; McQuail y Nicolle, 2015), hecho que dificulta establecer eventuales diferencias relacionadas con el sexo en el impacto del envejecimiento en rendimiento cognitivo. Por otro lado, se ha demostrado que la memoria espacial a largo plazo está deteriorada en ratones envejecidos según lo evaluado por la tarea de memoria de ubicación de objetos, mientras que la memoria de reconocimiento de objetos no se ve afectada (Wilmmer y col. 2012).

En el envejecimiento normal en ratas, se ha observado un deterioro significativo en la memoria de trabajo y de referencia espacial dependiente del hipocampo, evaluado mediante el laberinto acuático de Morris (MWM) (Gallagher, Burwell y Burchinal 1993; Vorhees y Williams 2006). En la mayoría de los estudios con roedores, la memoria espacial ha sido evaluada utilizando el laberinto acuático de Morris (MWM, Morris, 1984). Una desventaja potencial de la MWM en los estudios de envejecimiento es que requiere un importante grado de aptitud física.

Esto ha llevado a algunos investigadores a preferir el laberinto de Barnes, menos exigente físicamente y menos estresante (Barnes, 1979), especialmente para ratas de edad avanzada. Debido a este motivo en nuestro laboratorio hemos utilizado el laberinto de Barnes que tiene la ventaja de ser menos estresante para los animales envejecidos, donde hemos descrito el déficit de la memoria de referencia espacial (Morel y col. 2015). Se realizó 4 ensayos por día durante 5 días. En este estudio resolvimos hacer el Laberinto de Barnes modificado (abreviado), donde se realizó 2 ensayos por día durante 3 días. En ambas pruebas, las ratas aprenden a usar señales espaciales para guiarlos a una plataforma o túnel oculto. Mientras que el MWM implica la inmersión en agua, estímulo que provoca una liberación considerable de corticosterona y corticotropina (Sternberg y col., 1992), en el laberinto de Barnes, los animales se colocan en un espacio abierto, plataforma circular desprotegida para que caminen en busca del túnel de escape. Al quitar la caja de escape al final del período de entrenamiento, introdujimos el PT en nuestra variante de la prueba, lo que nos permitió evaluar parámetros dependientes de la memoria, tales como la latencia y los errores, así como la memoria espacial de largo plazo en dos periodos (PT1) (PT2).

En discusión con nuestros resultados que no encontramos diferencias entre las ratas MA y las jóvenes, otros investigadores encontraron un deterioro moderado de la memoria espacial a largo plazo (PT1 y PT2), según lo evaluado por latencia para escapar y número de errores, revelado por nuestro estudio está en relación con PTs en estudios MWM en jóvenes (3 meses) y ratas macho SD de mediana edad (12 meses) donde tampoco se detectaron diferencias de edad significativas en pruebas de plataforma (usando el tiempo de natación y la distancia de natación medidas) y en los PT (porcentaje de trayectoria de nado basada en el cuadrante correcto). Sin embargo, las ratas de 12 meses estaban deterioradas en la medición de los cruces

de la plataforma durante los PT (Fischer y col., 1992), parámetro que no hemos tenido en cuenta en nuestro análisis.

Evaluación de la actividad exploratoria

La habituación en OF nos permitió medir parámetros adicionales sobre el comportamiento general de los animales (crossing, entradas en el cuadrado central, rearing y grooming). Es importante mencionar que estos parámetros no se utilizan para detectar un déficit en la memoria (parámetros independientes de la memoria) de separación de patrones, solo se utilizan para observar si los animales cursan con otro factor que interfiera en el aprendizaje y la memoria.

El **número de líneas cruzadas (crossing)** suele usarse como una medida de la actividad locomotora, pero también es una medida de exploración y ansiedad. Una alta frecuencia de este comportamiento indica un aumento de la locomoción y exploración y/o un menor nivel de ansiedad. En nuestro estudio se evidencio que no hubo diferencias significativas en el desplazamiento entre ratas jóvenes y MA.

El **número de entradas en el cuadrado central** es una medida del comportamiento exploratorio y ansioso. Una alta frecuencia de este parámetro indica un comportamiento exploratorio alto y niveles de ansiedad bajos. (Tatem, K. S. y col.2014; Pan, J.-X. y col. 2018). Entre los tres parámetros anteriormente mencionados, solo encontramos diferencias significativas en el grooming. Las ratas MA presentan una disminución de la frecuencia de acicalamiento con respecto a sus controles jóvenes.

El **grooming** se estudia en relación con el contexto en el que tiene lugar. La presentación de este comportamiento puede verse influenciado por diferentes entornos y es sensible a los niveles de estrés (Kalueff & Tuohimaa, 2004; Komorowska & Pisula, 2003; Veloso, Filgueiras, Lorenzo, & Estaislau, 2016). Es un comportamiento frecuente de los roedores en un entorno novedoso y se espera que disminuya con la exposición repetida a la arena, a medida que decrece la ansiedad (Espejo, E. F., 1997).

Cuando los animales están expuestos a experiencias estresantes o novedosas, que es nuestro caso, es normal que aumente el grooming para bajar el nivel de estrés y ansiedad, ya que este acto de acicalarse es un indicador de atenuación a la tensión. Por ejemplo, Jolles, Rompa-Barendregt y Gispen (1979) demostraron que la exposición a la novedad aumenta la frecuencia de aseo en ratas en campo abierto. Además de la influencia ambiental, el acicalamiento parece estar relacionado con una función “desestresante” del estado de ansiedad, observándose una mayor frecuencia de este comportamiento en nuevos ambientes (Spruijt y col., 1992).

Los resultados de la OF en el trabajo de Pietrelli y col del 2012 han mostrado un aumento en los indicadores de comportamientos relacionados con la ansiedad y con la edad tales como la latencia, tiempo de permanencia en los cuadrantes periféricos, grooming, micción y gránulos fecales, estando en desacuerdo con un informe previo (Torras-García y col., 2005) que encontraron una disminución significativa y progresiva de la ansiedad en animales de mediana edad (17 meses) y viejos (24 meses) en comparación con animales jóvenes (3 meses). En relación con lo anteriormente mencionado en nuestro estudio se evidenció de igual manera una

disminución significativa en relación con la ansiedad tomando el parámetro de grooming en ratas de mediana edad con respecto a las jóvenes, ya que el resto de los parámetros analizados no dieron diferencias significativas tales como latencia, errores, rearing y crossing. Es sabido que a medida que envejecemos tenemos una menor respuesta a estímulos novedosos ((Torras-García y col., 2005), por lo tanto, podemos afirmar que las ratas MA tienen menos grooming ya que el estímulo de la novedad se hace cada vez más débil a medida que son sometidas a un nuevo ensayo de habituación, con respecto a las jóvenes que responden con una frecuencia mayor de grooming. Dicho de otra manera, se puede afirmar que la motivación va disminuyendo en las ratas MA, ya que a medida que pasa el tiempo se van habituando más rápidamente.

Evaluación de la memoria de separación de patrones en ratas de mediana edad utilizando una prueba de reconocimiento espontáneo de la novedad. (SLR: Spontaneous Location Task)

Se sabe que, en el hipocampo, particularmente las neuronas inmaduras en el DG realizan la separación de patrones de los estímulos que llegan desde la corteza entorrinal (Morris AM y col., 2012). Por ello, se buscó evaluar la memoria de separación de patrones utilizando una prueba de reconocimiento de la novedad utilizando ratas naive debido a que las ratas del protocolo A, al que se les realizó el Test de Barnes ya fueron habituadas y aprendidas. En este trabajo no pudimos evidenciar que existe un déficit en la memoria debido a que los controles jóvenes de 4 meses de edad tampoco pudieron reconocer la nueva ubicación del objeto.

El hecho de no observarse preferencia por el objeto nuevo para los grupos estudiados, entendiendo por “objeto nuevo” al cambio en la distancia espacial existente entre los objetos presentados, lo cual podría significar que la distancia utilizada (15cm) es muy sutil, por lo tanto, los animales no pueden codificar la nueva ubicación como diferente, tanto el grupo de interés MA como el control joven. Aunque estudios recientes realizados en nuestro laboratorio determinaron que la memoria de reconocimiento de objetos se encuentra deteriorada tanto en ratas MA como en ratas viejas cuando la variable a discernir es la ubicación espacial del objeto (Canatelli-Mallat y col. 2022) utilizando una muestra de animales mayor N=12 jóvenes, 15 MA y 13 viejas, en el presente trabajo solo se tuvieron 4 ejemplares de las edades jóvenes y MA, pudiendo estimar el resultado negativo por un menor número de muestra. Otra diferencia es el laberinto, el cual tiene diferentes dimensiones y forma, es decir el del mencionado trabajo era circular de 90cm de diámetro de la arena x 30 cm de alto de las paredes, en dicho trabajo es laberinto cuadrado de 65x65cm x 45cm de altura. Para determinar la distancia mínima del desplazamiento del objeto para el SRL Cantarelli y colaboradores tomaron 18 animales jóvenes y se los dividió en dos grupos A a una distancia de 15 cm y el B a una distancia de 20 cm, siendo opción última donde se evidencian diferencias significativas. En contraposición con nuestro trabajo donde la distancia que fue puesta la novedad fue a 15 cm, siendo no suficiente la distancia.

Por otro lado, nuestros datos son consistentes con los estudios realizados en el 2015 por el autor Van Hagen B.T.J y sus colaboradores utilizando ratas macho Wistar de tres meses de edad realizando un estudio de separación de patrones evidenciaron que con las ratas el comportamiento exploratorio general no difirió entre las posiciones diferentes (posición 1 y 2

dieron no significativas, mientras que en las restantes que estaban más alejadas, a 30cm de distancia si dieron significativas). El diseño del laberinto que ellos utilizaron fue circular de 83 cm de diámetro y con respecto a la elección de los objetos, a diferencia de nuestro experimento, donde utilizamos tres objetos similares moviendo solo uno en el segundo ensayo a una distancia relativamente cerca de la primera, 15cm, como ya lo mencioné anteriormente, solo se estudió una posición cambiada de la original y quizás no fue suficiente para los animales poder diferenciar los objetos. En el experimento de Van Hagen usaron dos objetos, pero en 5 diferentes posiciones. Se debe tener en cuenta que en nuestro ensayo se utilizaron ratas hembra jóvenes y de mediana edad, y en el trabajo anteriormente mencionado solo jóvenes (van Hagen B.T.J. y col. 2015).

Análisis Morfométrico

Mientras que algunos estudios han sugerido que en el hipocampo del cerebro humano la neurogénesis en el DG es un fenómeno robusto generando diariamente cientos de neuronas nuevas (Eriksson y col 1998, Spalding 2013, Boldrini 2018), otros encontraron una pequeña evidencia de neuronas progenitoras y jóvenes (Ciprini y col. 2018, Paredes 2018, Sorrels 2018).

Dado que DCX está localizado en el citoplasma de neuronas inmaduras, su morfología se vuelve apreciable en estudios inmunohistoquímicos con anticuerpos contra DCX. Por tanto, se eligió este método para realizar la morfometría en la zona DG para los tres grupos etarios.

La cantidad de neuronas inmaduras DCX+ en el grupo MA resultó similar a la cantidad obtenida para ratas seniles demostrando que el proceso de neurogénesis se encuentra disminuido mucho antes de la vejez.

En consistencia con otros trabajos utilizando otros marcadores de neurogénesis, la expresión de DCX en el hipocampo de roedores disminuye fuertemente con la edad (Heine y col., 2004a, b; Lucassen y col., 2010; Oomen y col., 2007; Rao y col., 2006).

Un mecanismo para este deterioro es el 80% de la disminución de la neurogénesis adulta en el DG hacia la mediana edad (Kuhn y col., 1996; Rao y col., 2006). Rao y col. observaron un 41% en la disminución de la producción de nuevas neuronas en el DG de ratas (Fischer 344) entre 7,5 y 9 meses de edad, y una reducción adicional del 39% para cuando las ratas alcanzaron los 12 meses. En nuestras ratas hembra SD de 12 meses cuantificamos una disminución del 94%.

El envejecimiento prematuro de la neurogénesis del hipocampo en ratas MA nos brinda la posibilidad de utilizar esta cohorte en experimentos de terapias protectoras que restauren la función cognitiva, como un paso previo a la intervención en ratas seniles de 24 meses de edad, reduciendo así el tiempo y el costo necesario para la evaluación de diferentes estrategias terapéuticas.

6.1 Conclusión

En resumen, en el presente trabajo evaluamos dos aspectos de la memoria espacial: la retención a largo-plazo de la ubicación de la caja de escape en el laberinto de Barmes (memoria de referencia) y la capacidad de separar memorias solapadas con distinguir cambios sutiles en la ubicación del objeto (separación de patrones) en el test de reconocimiento espontáneo de la novedad su duración y la memoria de separación de patrones.

La rata MA no mostró diferencia con su contraparte joven en la retención de la memoria de referencia, así como tampoco en la memoria de separación de patrones.

La rata MA es un excelente modelo para estudios sobre los mecanismos que conducen a la disminución de la neurogénesis en el hipocampo.

La rata MA es excelente modelo para estudios interventivos de terapia restaurativa de la neurogénesis en el hipocampo, como un paso previo al estudio de ratas seniles 24 meses de edad, reduciendo así el tiempo necesario para la obtención de datos sobre el efecto de moléculas terapéuticas, así como también los costos de mantenimiento.

Es difícil medir la neurogénesis en las ratas de mediana edad con un método comportamental y poder encontrar diferencias cognitivas con los métodos empleados en esta tesis. Hay muchos factores para tener en cuenta para poder encontrar la metodología de trabajo para diferenciar la separación de patrones en ratas de mediana edad o en su defecto viejas. Tales como; la distancia entre los objetos, el ambiente, el momento del día en que se hace el ensayo, el material de los objetos, el tamaño de la arena, el tiempo al que se los deja explorar a los animales, los objetos, etc. Es por eso que hay que seguir poniendo a punto el método por el cual se quiere evidenciar la pérdida de neurogénesis a partir de ensayos comportamentales con un método como separación de patrones.

CAPÍTULO 2

7.1 Hipótesis

La terapia génica con IGF-I icv restaura la plasticidad glial y la inmunoreactividad de las neuronas maduras en la región CA3 del hipocampo de la rata SD de 28 meses de edad.

7.1.1 Objetivos específicos

1. Cuantificar utilizando el método de medición del área inmunoreactiva y análisis cuantitativo de Sholl de astrocitos en la región CA3 del hipocampo, marcados mediante inmunohistoquímica para GFAP, en las ratas seniles SD de 28 meses tratadas por vía intracerebroventricular (i.c.v.) con RAd-IGF-I durante 17 días y compararlas con sus contrapartes controles tratadas con un RAd-DSRed.
2. Cuantificar el número de neuronas maduras utilizando el método del disector óptico en la región CA3 del hipocampo, marcadas mediante inmunohistoquímica para NeuN, las ratas seniles de 28 meses SD tratadas con RAd-IGF-1 i.c.v. durante 17 días y compararlas con sus contrapartes controles tratadas con un RAd-DSRed.

7.2 Materiales y Métodos

7.2.1 Animales

Se utilizaron 11 ratas hembra SD de 28 meses criadas en las instalaciones de animales de nuestra Institución (INIBIOLP). Los animales se dividieron aleatoriamente en dos grupos. El grupo IGF-I, (6 individuos) que recibirá la terapia con RAd-IGF-I, y el grupo control DsRed, (5 individuos) que recibirá el RAd-DsRed que no expresa el gen terapéutico, pero si es expuesto a la misma manipulación quirúrgica.

Los animales se alojaron en una habitación con temperatura controlada (22 ± 3 ° C) en un ciclo de luz/oscuridad de 12:12 h., con comida y agua disponibles *ad libitum*. Todos los experimentos con animales se realizaron siguiendo las Pautas de Bienestar Animal del Comité Institucional para el Cuidado y el Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL). La aceptabilidad ética de nuestros protocolos con animales fue aprobada por el CICUAL de la Facultad de Ciencias Médicas, UNLP (P02-01-2017).

7.2.2 Vectores adenovirales

Se empleó un vector adenoviral que expresa el ADNc de IGF-I de rata y un vector adenoviral control que expresa el ADNc de la DsRed, ambos bajo el promotor del citomegalovirus murino (CMVm).

RAAd-IGF-I.- Vector recombinante adenoviral (RAAd) portador del cDNA para rata IGF-I, construido en nuestro laboratorio en 2004 y utilizado extensamente por nuestro grupo y por otros. El transgén se encuentra bajo el control del promotor murino del cytomegalovirus (mCMV).

RAAd-(DsRed). - Este adenovector, también construido en nuestro laboratorio, expresa el gen de la proteína fluorescente roja DsRed2, de *Discosoma sp.* y está también bajo el control del promotor del mCMV.

7.2.3 Mantenimiento y manipulación de vectores virales

A la preparación del RAAd purificado se le adicionó 10% de glicerol, se alicuotó en tubos eppendorf correctamente rotulados y se conservó a -70°C hasta su titulación y posterior utilización.

7.2.4 Cirugía estereotáxica

Las ratas fueron anestesiadas con una inyección de clorhidrato de ketamina (40 mg/kg; i.p.) más clorhidrato de xilazina (8 mg/kg; i.m.) y posicionadas en un aparato estereotáxico (Firua 28 A).

Se realizaron inyecciones en los ventrículos laterales (VL) (Figura 28 B). Para acceder a ellos, se colocó la aguja 26G de una jeringa Hamilton de 10ul en las siguientes coordenadas en relación con el bregma: -0.8mm anteroposterior; 4.1 mm dorsoventral; +/- 1.5mm mediolateral (Paxinos G y Watson C 1998).

A las ratas se les inyectó bilateralmente 8 μl por lado de una suspensión que contenía 10^{10} unidades formadoras de placa (ufp) del apropiado vector. (Figura 29)

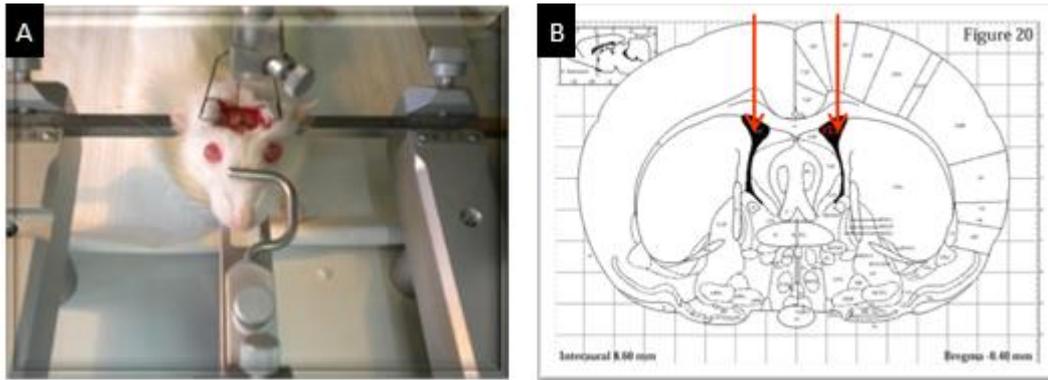


Figura 29. Cirugía estereotáxica en una rata. Rata anestesiada ubicada en un aparato estereotáxico para realizar las perforaciones en el cráneo en las posiciones adecuadas para la canulación y las inyecciones icv posteriores (A). Esquema de un corte coronal de cerebro en el cual se marcan con flechas rojas las inyecciones icv, y en negro los ventrículos laterales. Bregma -0.40 mm. Figura adaptada de Paxinos y Watson (B).

7.2.5 Eutanasia y procesamiento de cerebros (Ver Sección 3.1.4 de la primera parte)

8.1 Diseño experimental

Experimento 3

El día de la inyección del vector se definió como día experimental 0. Antes y después de la inyección de vector, se realizó una prueba de Barnes completa, que comprende seis AT y un PT en todas las ratas y se procedió a la eutanasia de los animales por perfusión intracardiaca como se ilustra esquemáticamente en la Figura 30.

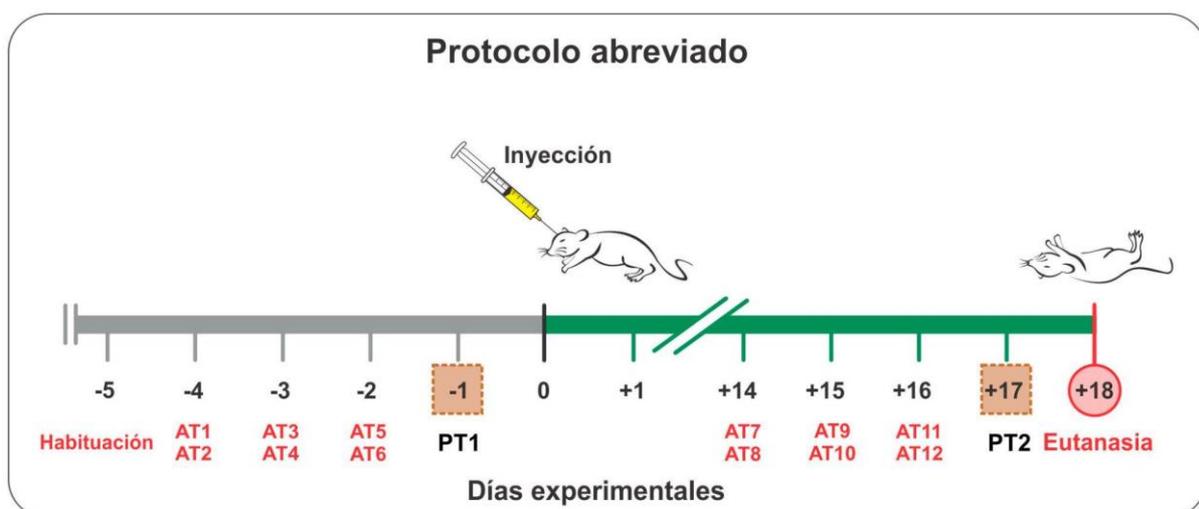


Figura 30. Diseño experimental: En esta figura se observa un protocolo abreviado donde se realizó una habituación, luego tres días de acquisition trial (AT) dos veces al día, al siguiente día se realizó de probe trial (PT). A continuación, se realizó la inyección y se dejó descansar 14 días para que haga efecto la terapia.

Posteriormente se realizó tres días de AT (dos veces al día). A continuación, se llevó a cabo el segundo PT. Y por último la eutanasia de los animales.

8.2 Inmunohistoquímica

Todas las técnicas inmunohistoquímicas se realizaron en secciones flotantes. Para cada animal, se realizaron conjuntos separados de secciones inmunohistoquímicamente procesados usando un anticuerpo monoclonal 1: 500 (Sigma, Saint Louis, MO) GFAP para ratón, anticuerpo ratón anti-NeuN (marcador de núcleos neuronales; con una dilución 1:850; Millipore Cat# MAB377.) Brevemente, después de la incubación durante la noche a 4°C con el anticuerpo primario, las secciones se incubaron con antisuero biotinilado anti-ratón de caballo (1: 300, BA-2000; Vector Labs.) o antisuero anti-cabra de caballo (1: 300, BA-9500, Vector Labs) anticuerpo biotinilado de cabra anti-ratón (con una dilución 1:300; Vector Laboratories Cat# BA-9200) durante 120 min, luego se enjuagó e incubó con complejo avidina-biotinperoxidasa (1: 500, PK-6100; Vector ABC Elite Kit) por 90 min y posteriormente se incubó con tetrahidrocloreuro de 3,3-diaminobencidina. Las secciones se deshidrataron, se montaron con Vectamount (Vector) y se utilizaron para el análisis de imágenes. Posteriormente las secciones inmunoteñidas para GFAP se contratiñeron con violeta de cresilo (tinción de Nissl) como se describe en otros lugares (Morel y col., 2015).

8.3 Análisis de imagen

En cada bloque hipocampal, se seleccionaron una de cada seis secciones seriadas para obtener un conjunto de secciones en serie no contiguas que abarca la porción dorsal del hipocampo, que típicamente comprende aproximadamente 48 secciones coronales, lo que da como resultado ocho conjuntos de secciones en serie no contiguas (240um de separación) y generalmente se encuentra entre las coordenadas de 2,8 mm y 4,5 mm con respecto al bregma (Paxinos y Watson, 1998). Se determinará el fondo de las imágenes ajustando manualmente la ventana de densidad del sistema (West, 1993).

Para el análisis estereológico se utilizó un microscopio Olympus BX-51 conectado a una Olympus DP70 Cámara de video CCD (Tokio, Japón) y para el conteo neuronal fue utilizado el disector óptico. (West y col., 2004).

8.4 Análisis de los astrocitos hipocampales

8.4.1 Medición del área inmunoreactiva para GFAP

Se midió el área inmunorreactiva (ir) de GFAP de imágenes calibradas de la región de CA3, tomadas con un objetivo 100X. Se hace una segmentación de color del área inmunorreactiva del campo considerado utilizando el programa Image Pro Plus v5.1. Para ello, se fotografiaron y analizaron astrocitos GFAPir de la región CA3. Luego se estima el valor por ssf. (Figura 31)

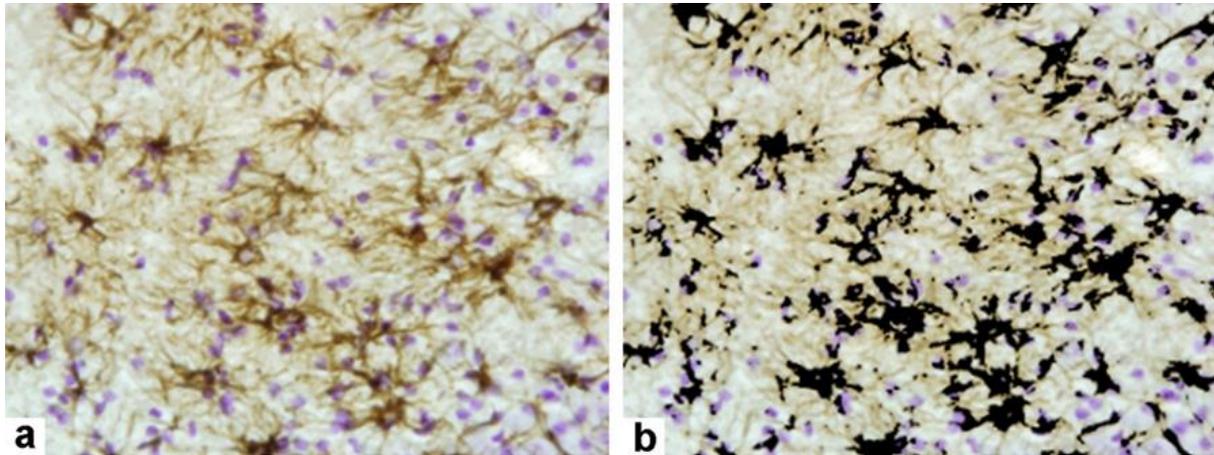


Figura 31: Imagen a: Células positivas para GFAP con tinción DAB. **Imagen b:** Células segmentadas por color (Image J.) mostrando el área inmunoreactiva para GFAP en la región CA3 del hipocampo.

8.4.2 Medición de los procesos astrocitarios por análisis de Sholl

Para estudiar la complejidad de procesos astrogliales, los astrocitos GFAPir se evaluaron mediante el análisis de Scholl (Scholl 1953). De cada rata, se eligieron 25 astrocitos al azar a partir de imágenes tomadas con gran aumento (1000x) en secciones coronales representativas al azar que abarcaba la región CA3. Posteriormente las imágenes se convirtieron en monocromáticas de 8 bits y se analizaron mediante el plugin de análisis Image J Sholl (<http://imagej.net/sholl>). Esta técnica consiste en superponer una máscara de anillos concéntricos distribuidos a distancias iguales (5 μ m), centradas en un soma celular. Se calculó el número de intersecciones de los procesos por anillo (i) y un índice de complejidad de las ramificaciones. Posteriormente, se estimó la longitud total de los procesos mediante la suma de los valores de i para cada anillo multiplicado por 5 (distancia entre los anillos). Se promedió para cada astrocito, la longitud de los procesos y su complejidad de ramificaciones a cada distancia del soma, estos datos se utilizaron para el análisis estadístico.

8.4.3 Medición del número de neuronas piramidales en CA3 por el método del disector óptico

Con el fin de analizar una posible neurodegeneración, se determinó el número de neuronas para NeuN. Para este propósito, se segmentan digitalmente cuatro secciones anatómicamente emparejadas por animal y tres campos por sección correspondientes a las neuronas de la capa piramidal CA3. El número total de células se estimó utilizando una versión modificada del método del disector óptico (West, 1993). Las estimaciones individuales del número total de neuronas (N) para cada región se calcularon de acuerdo con la siguiente fórmula: $N = RQ\Sigma \times \frac{1}{ssf} \times \frac{1}{asf} \times \frac{1}{tsf}$, donde RQ Σ es la suma de las neuronas contadas, ssf es la fracción de muestreo de sección, asf es la fracción de muestreo de área y tsf es la fracción de muestreo de

espesor. En todos los casos, se utilizó el software Image Pro Plus v5.1 (IPP, Media Cybernetics) para los análisis.

8.5 Análisis estadístico

El número de intersecciones de los astrocitos fue promediado para cada rata, y se llevó a cabo el análisis estadístico entre los grupos experimentales usando ANOVA de dos vías. Todos los datos fueron presentados como medias \pm error medio estándar (SEM) y analizados usando el software Sigma Plot. El área inmunoreactiva para GFAP, y el número de neuronas NeuN+ fue promediada para cada grupo y se llevó a cabo el análisis estadístico entre los grupos experimentales usando t-test. Para ambos análisis, $P < 0.05$ fue establecido como significativo.

9.1 Resultados

9.1.1 Objetivo 1

La terapia con IGF-I muestra un aumento del área inmunoreactiva para GFAP

Como se observa en la **Figura 32**, se encontraron diferencias significativas entre los grupos tratados con IGF-I, y el grupo control DS-Red, utilizando como método estadístico el análisis no paramétrico Mann Whitney con el test de Wilcox $W = 23$ ($P = 0,03175$). (Figura 32)

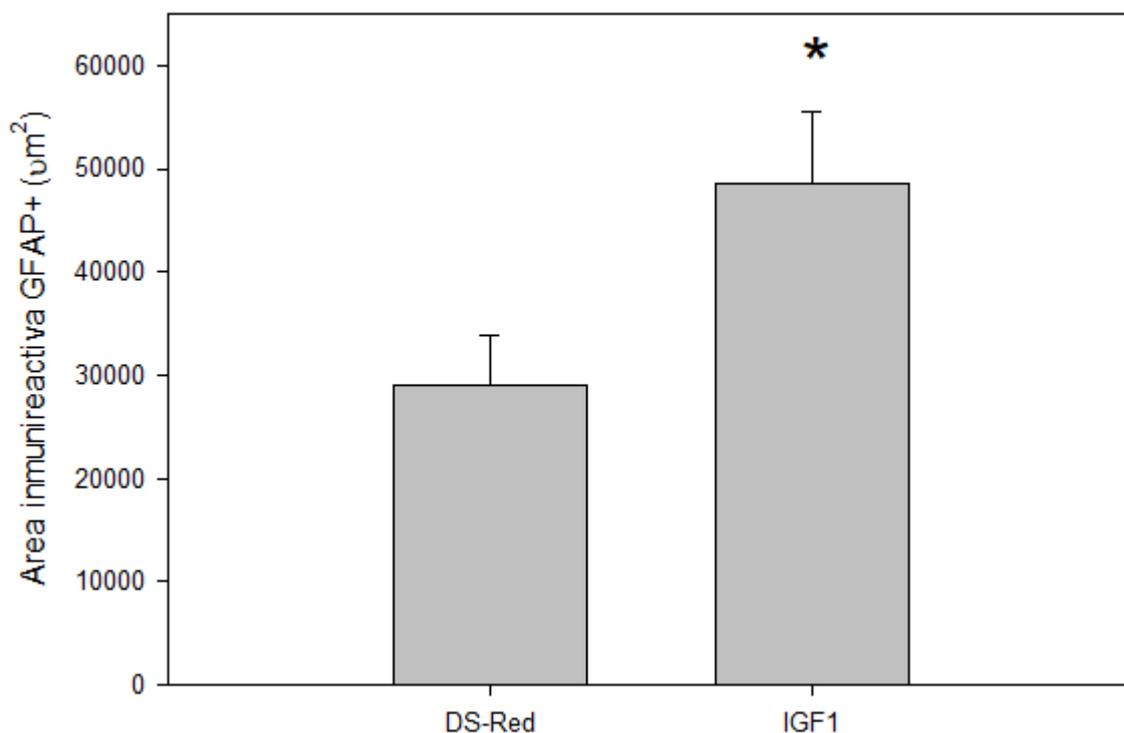


Figura 32. Área inmunoreactiva para GFAP+ para animales con tratamiento IGF1 y animales control DS-Red en CA3. Se observa un aumento de la inmunoreactividad del 1.5 veces con respecto al control.

Cuantificación de los procesos de los astrocitos mediante el análisis de Scholl en CA3

Como puede observarse en la Figura 33, utilizando el test paramétrico ANOVA de dos vías de medidas repetidas, tomando como factores el tratamiento con IGF-I y la distancia del soma no encontrando diferencias significativas no hay diferencias en el número de intersecciones de células astrogiales mediante el análisis de Sholl. (P=0.544)

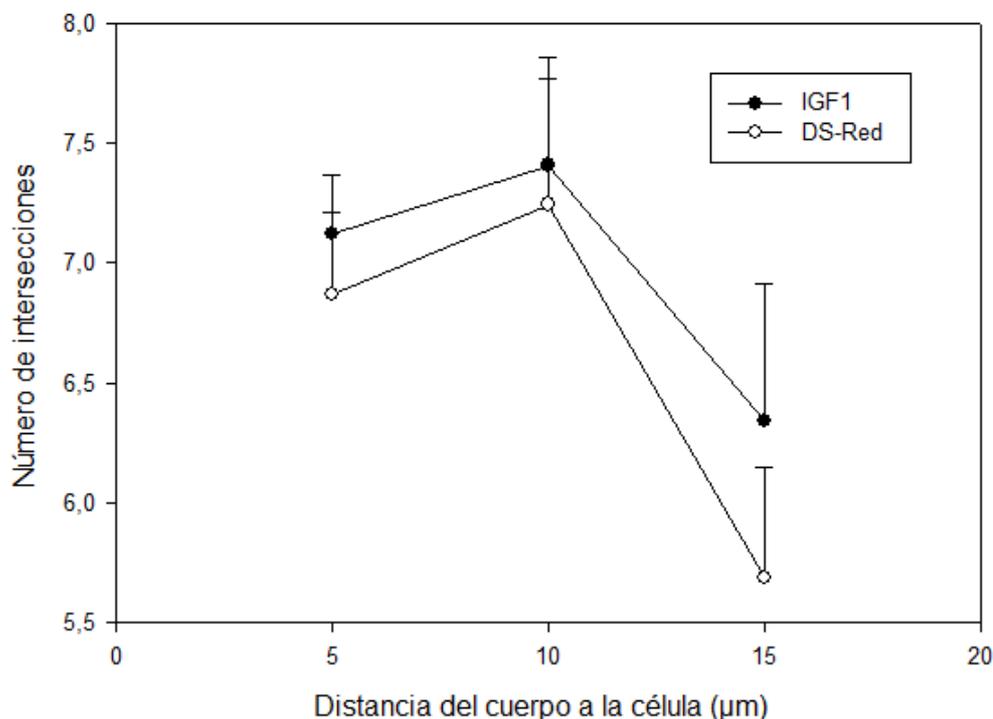


Figura 33. Complejidad de intersecciones de los procesos gliales GFAP + de la región CA3 del hipocampo en ratas seniles. El promedio de la longitud de los procesos astrogiales en los grupos IGF-I y DS-Red en la región CA3. Se tomaron 3 distancias (5, 10 y 15) del soma.

9.1.2 Objetivo 2

Conteo de neuronas piramidales NeuN+ en CA3

Como resultado se observa en la Figura 34 que el número de neuronas totales NeuN+ no resultó tener diferencias significativas para los grupos tratados con RAd-IGF-1 y placebo con RAd-DSRed empleando el análisis estadístico t-test ($t = 1.271$ con 9 grados de libertad; $P = 0.235$).

CA3

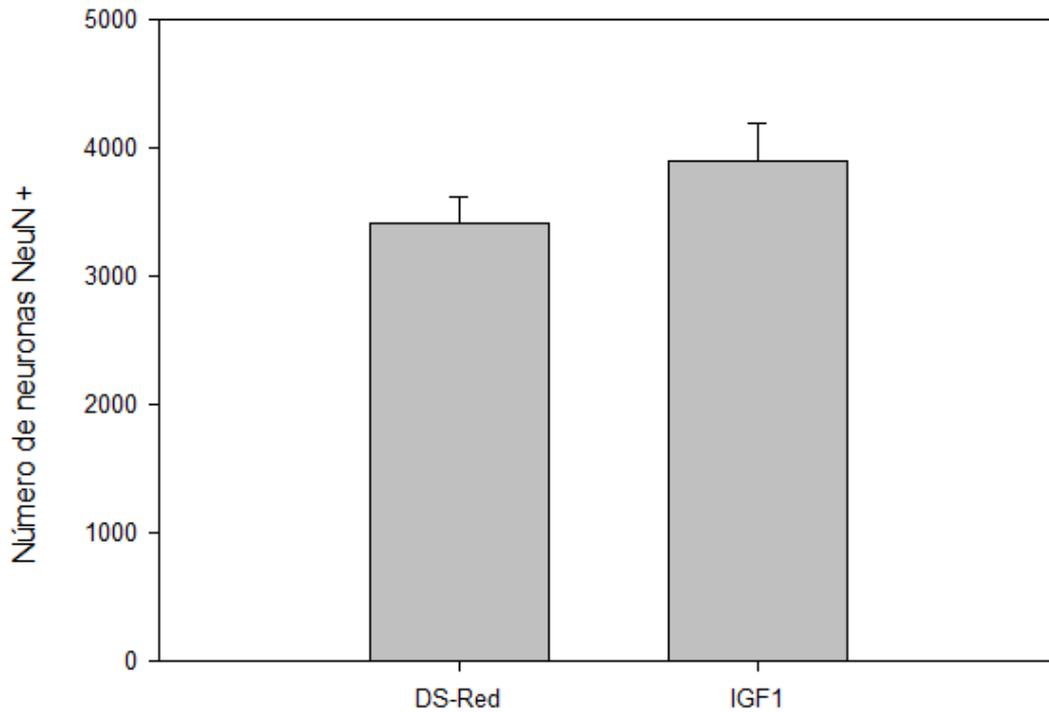


Figura 34. Conteo de células neuronales NeuN+ para animales con tratamiento IGF1 y animales control DS-Red.

10.1 DISCUSION

Acción restaurativa de la terapia génica con el factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I)

Estudios previos de estrategias de terapia génica neuroprotectora con IGF-1 realizados en nuestro laboratorio, analizaron zonas del hipocampo como CA1, SR y DG sin abordar la zona CA3. Es por ello que en el presente trabajo centramos nuestra evaluación histológica en las neuronas piramidales de CA3 y en los astrocitos, por ser un área vulnerable a la neurodegeneración, al envejecimiento senil, en pacientes con EA, así como también es clave para la formación de la recuperación de la memoria espacial. (Padurariu M y col., 2012).

Debido a que es bien sabido que se observa una reducción en los niveles de IGF-I en cerebros de ratas viejas dando como resultado un deterioro de las funciones cognitivas asociado al envejecimiento (Sonntag y col., 1980), hemos querido utilizar en dicho trabajo la ruta endimaria por ser la estrategia más adecuada para la terapia génica cerebral con IGF-I que ha sido ampliamente probado en la bibliografía que a través de las células endimarias se accede a las estructuras circundantes como el hipocampo (Hereñú y col., 2009) Elegimos un vector adenoviral para realizar la terapia génica icv basada en el hecho de que estos vectores son altamente selectivos para células endimarias, que son transducidas eficientemente por el

RAd-IGF-I y de esta forma poder aumentar sustancialmente los niveles de IGF-I en el LCR (Hereñu y col., 2009).

Importancia de los astrocitos en la región CA3

Durante muchos años se consideró a los astrocitos componentes importantes asociados a las neuronas, proporcionando apoyo metabólico, regulando las sinapsis por contacto directo (Nishida H, y col., 2007) y secretando factores solubles que se dirigen a sitios pre y postsinápticos, modulando así la estructura y función de las sinapsis tanto excitadoras como inhibitoras (Ullian EM, y col., 2001; Christopherson KS, y col., 2005; Mauch DH, y col., 2001). Los astrocitos muestran una activación creciente con la edad, un fenómeno que altera la función neuronal (Rozovsky y col., 2005). En este contexto, se sabe que GFAP, una proteína de filamento intermedio, se sobreexpresa en la astrología reactiva. La ramificación reducida en astrocitos envejecidos puede afectar la capacidad de estas células gliales para proporcionar apoyo trófico a neuronas. Es sabido que los astrocitos se vuelven reactivos en respuesta a lesiones u otros procesos patológicos. Se detecta astrogliosis (fenómeno que se caracteriza por una marcada hipertrofia de astrocitos y un moderado aumento en el número de estas células, Lindsey y col., 1979) reactiva en casi todo tipo de lesiones y trastornos neurológicos, generalmente en la etapa tardía de la neurodegeneración (Garcia AD, y col., 2004; Chaboub LS, y col., 2011,12,14).

En ratas, la astrogliosis hipocampal aumenta con la edad, siendo perjudicial para la función de las neuronas (Rozovsky y col., 2005). que es de inicio temprano en la mediana edad (13 meses). La astrogliosis se puede evidenciar con un aumento del número de células o con la disminución de los procesos celulares. Sin embargo, en un trabajo previo de nuestro laboratorio observamos una disminución del número de astrocitos en CA1 del hipocampo, lo que puede inferir que con el envejecimiento también se encuentre disminuido el soporte trófico de las células gliales en el hipocampo (Morel y col., 2015). Por lo tanto, los astrocitos menos ramificados en el hipocampo envejecido pueden ser menos efectivos para fortalecer la sinapsis. A partir de lo mencionado quisimos medir el área inmunoreactiva para GFAP en la región CA3 del hipocampo como parámetro de cambio en estas células, y observamos que en los animales tratados IGF1 aumentó el área inmunoreactiva con respecto al control. Aunque no se sabe si el aumento de la inmunoreactividad es beneficioso, sugerimos que dicho cambio pudo haber aumentado el número de astrocitos evidenciando un incremento de la plasticidad glial y el soporte trófico.

También se sabe que durante el envejecimiento normal disminuye el número de procesos en células astrogliales, y por tanto disminuye también el número de sinapsis y la regulación de señales (Morel y col., 2015). En este trabajo no evidenciamos una mejora en el número de procesos astrocitarios en los animales tratados con IGF-1. En un trabajo previo realizado por nuestro grupo encontramos una ligera pero significativa reducción en el área inmunorreactiva NeuN en la región CA3 en ratas MA y S (Canatelli-Mallat y col 2022). Nuestra hipótesis es que esta ligera disminución en las neuronas piramidales CA3 en las ratas más viejas podrían estar afectando las entradas sinápticas del DG, lo que contribuye a un deterioro en la memoria de reconocimiento.

En la presente tesis diseccionamos solamente la región CA3 por su rol en la recuperación de la memoria de separación de patrones evaluado en la etapa de selección del SLR, donde no evidenciamos cambios significativos en el número de neuronas maduras marcadas con NeuN en las ratas viejas de 28 meses de edad tratadas con IGF-1 versus sus contrapartes senescentes de 28 meses controles DSred.

Nuestros resultados son consistentes con observaciones en machos de cepa Long-Evans de 28 meses de edad (Rapp y Gallagher, 1996) no se detectó una pérdida significativa de neuronas teñidas con la técnica de Nissl en la parte dorsal del hipocampo.

Otros trabajos como Poe H, y col., (2001) estudiaron animales machos jóvenes de 4 meses, de mediana edad de 18 meses de edad y animales viejos de 29 meses de la cepa F1 Brown Norway x Fisher 344. Estudiaron animales tratados con IGF-1 en contraste con los animales placebo tratados con solución salina y observaron que el número de neuronas teñidas con toluidina no fue afectado con el avance de la edad. La densidad numérica de las neuronas piramidales de CA3 del hipocampo se mantuvo constante a lo largo de la vida, al igual que la densidad numérica de las sinapsis en el stratum lucidum del área CA3. Las neuronas fueron contadas con el disector físico (Sterio 1984), a diferencia de nuestro experimento en el que se contaron las neuronas piramidales de la región CA3 utilizando el disector óptico (West, 1993). A pesar del papel informado que posee IGF-1 en la sinaptogénesis y las mejoras en el comportamiento con la edad, la infusión del péptido IGF1 ventricular de este factor de crecimiento no afectó la densidad numérica de neuronas o sinapsis en ratas de 29 meses en comparación con ratas viejas inyectadas con solución salina. (Poe B. H. y col., 2001)

11.1 CONCLUSION

La terapia génica con IGF-1 mostró un aumento en el área inmunoreactiva para GFAP+ en la zona CA3 comparado al grupo control DS-Red sin un incremento en los procesos astrocitarios. Con respecto al número de neuronas maduras marcadas con NeuN en CA3 con tratamiento IGF-1 no mostró diferencias.

12.1 Bibliografia

- Abdallah, Ben N. M. B., Slomianka, L., & Lipp, H. P. (2007). Reversible effect of X-irradiation on proliferation, neurogenesis, and cell death in the dentate gyrus of adult mice. *Hippocampus*, 17, 1230–1240. doi:10.1002/hipo.20358.
- Aimone, J. B., Deng, W., & Gage, F. H. (2011). Resolving New Memories: A Critical Look at the Dentate Gyrus , Adult Neurogenesis , and Pattern Separation. *Neuron*, 70(4),589–596.doi:10.1016/j.neuron.2011.05.010
- Altman J, Das GD. Post-natal origin of microneurons in the rat brain. *Nature*. 1965. 207, 953-956.
- Altman J (1969) Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis; IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol* 137:433-457.
- Allen N. J. “Astrocyte regulation of synaptic behavior”.*Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014;30:439-63. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100913-013053.
- Amaral, P. P., Neyt, C., Wilkins, S. J., Askarian-Amiri, M. E., Sunkin, S. M., Perkins, A. C., & Mattick, J. S. (2009). Complex architecture and regulated expression of the Sox2ot locus during vertebrate development. *RNA (New York, N.Y.)*, 15(11), 2013–27. doi:10.1261/rna.1705309
- AnnaS Mitchell, Rafal Czajkowski R, Zhang N, Jeffry K, Nelson A. Retrosplenial cortex and its role in spatial cognition. (2018)
- Anderson, M. L., Nokia, M. S., Govindaraju, K. P., & Shors, T. J. (2012). Moderate drinking? Alcohol consumption significantly decreases neurogenesis in the adult hippocampus. *Neuroscience*, 224, 202–209. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.08.018.
- Araque A., Parpura V., Sanzgiri R. P., Haydon P. G.”Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner”*Trends Neuroscience*. 1999 May;22(5):208-15. doi: 10.1016/s0166-2236(98)01349-6.
- Araque A., Sanzgiri R.P., Parpura V. , Haydon P.G.”Astrocyte-induced modulation of synaptic transmission”*Can J Physiol Pharmacol*. 1999 Sep;77(9):699-706.
- Akers, K. G., Kushner, S. A., Leslie, A. T., Clarke, L., Kooy, D. Van Der, Lerch, J. P., & Frankland, P. W. (2011). Fetal alcohol exposure leads to abnormal olfactory bulb development and impaired odor discrimination in adult mice. *Molecular Brain*, 4(1), 29. doi:10.1186/1756-6606-4-29

- Akers, K. G., Sakaguchi, M., & Arruda-Carvalho, M. (2010). Functional contribution of adult generated olfactory bulb interneurons: odor discrimination versus odor memory. *The Journal of Neuroscience*, 30(13), 4523–4525. doi:10.1523/JNEUROSCI.0443-10.2010.
- Backman L, Small BJ, Fratiglioni L. 2001. Stability of the preclinical episodic memory deficit in Alzheimer’s disease. *Brain* 124 (Part 1):96–102.
- Barres BA. The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron*. 2008;60(3):430–40
- Basarkar, Ashwin, y Jagdish Singh. 2007.” Nanoparticulate System for polynucleotide Delivery” *International Journal of Nanomedicine*. 2 (3): 353.60.
- Beaquis, J et al. 2010. “Hippocampal neurovascular and hypothalamic-pituitary-adrenal axis alterations in spontaneously type 2 diabetic GK rats.” *Exp Neurol* 222(1):125-134. Retrieved. (<http://ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list=20045412>).
- Beas, B. Sofia, Barry Seylow, y Jennifer L. Bizon. 2013. “Distinct Manifestations of Executive Dysfunction in Age Rats”. *Neurobiology of Aging* 34 (9): 2164-74 <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.03.019>.
- Bellini M. J. Dancing with glia: The role of astrocytes, Microglia and Oligodendrocytes and their relation with neurons in Neuroinflammation and aging. *Open Access Journal of Biomedical Science* 3. (2020)
- Benihoud, K., P. Yeh, y M. Perricaudet. 1999. “Adenovirus Vector for Gene Delivery”. *Current Opinion in Biotechnology* 10 (5):440-47.
- Bergelson, J.M, J. A. Cunningham, Droguett, E. A. Kurt-Jones, A. Krithivas, J. S. Hong, M. S. Horwitz, R. L. Crowell, y R. W. Fingerg. 1997. “Isolation of common Receptor for Coxsackie B Viruses and Adenoviruses 2 and 5” *Science (New York, N. Y.)* 275 (5304):1320-23.
- Bergen JM, Park IK, Horner PJ, POun SH. Nonviral approaches for neuronal delivery of nucleic acids. *Pharm Res*. 2008. May 25(5):983-98. Epub 2007 Oct 12. Review.
- Bigl, V, and R Schliebs. 1998. “Simulation of cortical cholinergic deficit—a novel experimental approach to study pathogenetic aspects of Alzheimer’s disease”. *J Neural Transm Suppl* 54:237-247. Retrieved (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9850932).
- Bischofberger J. Schmidt-Hieber C, Jonas P. Action potential initiation and propagation in hippocampal mossy fibre axons. *J Physiol*. 2008. 1;586 (7):1849-57.,

Janie Corley, Alan J. Gow, Sara E. Harris, Lorna M. Houlihan, Ricardo E. Marioni, Lars Penke, Snorri B. Rafnsson, y John M. Starr. 2009. "Age-Associated Cognitive Decline". *British Medical Bulletin* 92:135-52. <https://doi.org/10.1093/b/b/ibd033>.

- Boldrini M, Fulmore CA, Tartt AN, Simeon LR, Pavlova I, Poposka V, Rosollija GB, Stankov A, Arango V, Dwork AJ, Hen R, Mann JJ (2018) Human hippocampal neurogenesis persists throughout aging. *Cell stem Cell* 22:589-599.e5.
- Brandt MD, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G, Reuter K, Bick-Sander A, von der Behrens W, Kermpermann G (2003). Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Mol Cell Neurosci* 11:143.
- Bruce A. Yankner, M. Marsel Mesulam. B-Amyloid and the pathogenesis of alzheimer's disease. *Seminars in Medicine of Beth Israel Hospital, Boston*. 1991.
- Brywe, Katarina G., Carina Mallard, Malin Gustavsson, Maj Hedtjarn, Anna-Lena Leverin, Xiaoyang Wang, Klas Blomgren, Jorgen Isgaard, y Henrik Hagberg. 2005. "IGF-I Neuroprotection in the Immature Brain after Hypoxia-Ischemia, Involvement of Akt and GSK3beta? "The
- Blundell, T., y R. E. Humbel. 1980. "Hormone Families: Pancreatic Hormones and Homologous Growth Factors". *Nature* 287 (5785): 781-87.
- Breese, C. R., A. D'Costa, Y. D. Rollins, C. Adams, R. M. Brooze, W. E. Sonntag, y S. Leonard. 1996. "Expression of Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) and IGF-Binding protein 2 (IGF-BP2) in the Hippocampus Following Cytotoxic Lesion of the Dentate Gyrus". *The Journal of Comparative Neurology* 369 (3):388-404. [https://doi.org/10.1002/\(SCI\)1096-9861\(19960603\)369:3<388::AID-CNE5>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SCI)1096-9861(19960603)369:3<388::AID-CNE5>3.0.CO;2-1).
- C.A. Barnes. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psychol*, 93 (1979), pp. 74–104
- Campos, Samuel K., y Michael A. Barry. 2007" Current Advances and Future Challenges in Adenovirus Vector Biology and Targeting". *Current Gene Therapy* 7 (3):189-204.
- Canatelli-Mallat M , Priscila Chiavellini , Marianne Lehmann , Rodolfo Gustavo Goya , Gustavo Ramon Morel. "Age-related loss of recognition memory and its correlation with hippocampal and perirhinal cortex changes in female Sprague Dawley rats". (2022)
- Cancino, G. I., Yiu, A. P., Fatt, M. P., Dugani, C. B., Flores, E. R., Frankland, P. W., Kaplan, D. R. (2013). p63 Regulates adult neural precursor and newly born neuron survival to control hippocampal-dependent Behavior. *The Journal of Neuroscience*, 33(31), 12569–12585. doi:10.1523/JNEUROSCI.1251-13.2013

- Carro, E. J. L., Trejo, A., Grerber, H., Loetscher, J., Torrado, F., Metzger, y I. Torres-Aleman. 2006. “Therapeutic Actions of Insulin-like Growth Factor I on APP/PS2 Mice with Severe Brain Amyloidosis”. *Neurobiology of Aging* 27 (9): 1250-57. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.06.015>.
- Chaboub LS, Deneen B. Developmental origins of astrocyte heterogeneity: the final frontier of CNS development. *Developmental neuroscience*. 2012;34(5):379-88. PubMed PMID: 23147551. Pubmed Central PMCID: PMC3576470. Epub 2012/11/14. eng.
- Chambers, R A, M N Potenza, R E Hoffman, and W Miranker. 2004. “Simulates apoptosis/neurogenesis regulates learning and memory capabilities of adaptive neural networks. “ *Neuropsychopharmacology* 29(4): 747-758. Retrieved. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14702022).
- Chohan, M. O., Li, B., Blanchard, J., Tung, Y.-C., Heaney, A. T., Rabe, A., ... Grundke-Iqbal, I. (2011). Enhancement of dentate gyrus neurogenesis, dendritic and synaptic plasticity and memory by a neurotrophic peptide. *Neurobiology of Aging*, 32(8), 1420–34. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2009.08.008.
- Colgin L. L., Edvard I Moser, May-Britt Moser. “Understanding memory through hippocampal remapping” . *Trends Neuroscience*. 2008 Sep;31(9):469-77. doi: 10.1016/j.tins.2008.06.008.
- Couillard-Despres s, Beate Winner, Susanne Schaubeck, Robert Aigner, Maurice Vroemen, Norbert Weidner, Ulrich Bogdahn, Jürgen Winkler, Hans-Georg Kuhn, Ludwig Aigner. “Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis”. *Eur J Neuroscience*. 2005 Jan;21(1):1-14. doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03813.x.
- Christopherson K. S., Ullian E. M., Stokes C.C. A., Mallowney Ch. E., Hell J. W., Agah A., Lawler J., Mosher D. F., Bornstein P., Barres B. A.”Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis”.*Cell*. 2005 Feb 11;120(3):421-33. doi: 10.1016/j.cell.2004.12.020.
- Cipriani S, Ferrer I, Aronica E, Kovacs GG, Verney C, Nardelli J, Khung S, Delezoide AI, Milenkovic I, Rasika S, Manivet P, Benifla JL, Deriot N, Gressens P, Adle-Biassette H (2018) Hippocampal radial glial subtypes and their neurogenic potential in human fetuses and healthy and Alzheimer’s disease adults, *Cereb Cortex* 28:2458-2478.
- Clelland CD, Choi M, Romberg C, Clemenson DG Jr, Fagniere A, Tyers P, Jessberger S, Saksida LM, Barker RA, Gage FH, et al. 2009. A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science* 325:210–213.
- Crystal, Ronald G. 2014. Adenovirus: The First Effective In Vivo Gene Delivery Vector”. *Human Gene Therapy* 25 (1):3:11. <https://doi.org/10.1089/hum.2013.2527>.

- Cuadrado-Tejedor M, Garcia-Osta A. Current animal models of Alzheimer's disease: challenges in translational research. *Front Neurol*. 2014 Sep 29;5:182.
- Creer, D. J., Romberg, C., Saksida, L. M., van Praag, H., & Bussey, T. J. (2010). Running enhances spatial pattern separation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 2367–2372.
- Davison, Andrew J., Maria Benko, y Balazs Harrach. 2003."Genetic Content and Evolution of Adenoviruses". *The Journal of General Virology* 84 (Pt 11): 2895-2908. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19497-0>.
- Daselaar SM, Rombouts SA, Veltman DJ, Raaijmakers JG, Jonker C. 2003a. Similar network activated by young and old adults during the acquisition of a motor sequence. *Neurobiol Aging* 24:1013–1019.
- Deary, Ian J., Janie Corley, Alan J. Gow, Sarah E. Harris, Lorna M. Houlihan, Riccardo E. Marioni, Lars Penke, Snorri B. Rafnsson, y Jhon M. Starr. 2009. "Age-associated Cognitive Decline". *British Medical Bulletin* 92:135-52. <https://doi.org/10.1093/bmb/Idp033>.
- D' Ercole, A. J. A. D. Stiles, y L. E. Underhood. 1984. "Tissue Concentrations of Somatomedin C: Further Evidence for Multiple Sites of Synthesis and Paracrine or Autocrine Mechanism of Action" *Proceeding of the National Academy of Science of the United State of America* 81 (3): 935-39.
- De Laporte, Laura, Jennifer Cruz Rea, y Lonnie D. Shea. 2006. "Design of modular non-viral gene therapy vectors". *Biomaterials* 27 (7): 947-54. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.09.036>.
- Demencia-OMS 2018. World Health Organization. <http://www.who.int/news-room/factsheets/details/dementia>.
- Déry, N., Pilgrim, M., Gibala, M., Gillen, J., Wojtowicz, J. M., Macqueen, G., & Becker, S. (2013). Adult hippocampal neurogenesis reduces memory interference in humans: opposing effects of aerobic exercise and depression. *Frontiers in Neuroscience*, 7, 66. doi:10.3389/fnins.2013.00066
- Deshmukh SS, Knierim JJ. Representation of non-spatial and spatial information in the lateral entorhinal cortex. *Front Behav Neurosci* 2011 Oct 28;5:69.
- Diana, R. A., Yonelinas, A. P. & Ranganath, C. Imaging recollection and familiarity in the medial temporal lobe: a three-component model. *Trends Cogn Sci* 11, 379-386, doi:10.1016/j.tics.2007.08.001 (2007).
- Dityatev, A., Dityateva, G., Sytnyk, V., Dellling, M., Toni, N., Nikonenko, I., ... Schachner, M. (2004). Polysialylated neural cell adhesion molecule promotes remodeling and formation of hippocampal synapses. *The Journal of Neuroscience* :

The Official Journal of the Society for Neuroscience, 24(42), 9372–82.
doi:10.1523/JNEUROSCI.1702-04.2004

- Dore, S., S. Kar, y R. quiron. 1997. “ Insulin-like Growth Factor I PrpTECTS and Rescues Hippocampal Neurons against Beta-Amyloid-and Human Amylin-induced Toxicity”. *Proceedings of the National Academy of Science of the United State Of America* 94 (9): 4772-77.
- Dubé ID, Cournoyer D. Gene Therapy: here to say. *CMAJ* 1995 May 15;152(10):1605-13 Review.
- Dudai, Y. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol* 55, 51-86, doi:10.1146/annurev.psych.55.090902.142050 (2004).
- Eckenhoff, M. F. & Rakic, P. Radial organization of the hippocampal dentate gyrus: a Golgi, ultrastructural, and immunocytochemical analysis in the developing rhesus monkey. *J Comp Neurol* 223, 1-21, doi:10.1002/cne.902230102 (1984).
- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, a M., Nordborg, C., Peterson, D. a, & Gage, F. H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Medicine*, 4(11), 1313–7. doi:10.1038/3305.
- Espejo, E. F. Structure of the mouse behavior on the elevated plus-maze test of anxiety. *Behavioural Brain Research* 86, 105–112 (1997).
- Fan, Dawei, Yassar Alarmri, Karen Liu, Michael MacAskill, Paul Hrris, Margaret Brimble, John Dalrymple-Alford, y col. 2018. “Supplementation of Blackcurrant Anthocyanins Increased Cyclic Glycine-Proline in the Cerebrospinal Fluid of Parkinson Patients: Potential Treatment to Improve Insulin-Like Growth Factor-1 Function”. *Nutrients* 10 (6).<https://doi.org/10.3390/nu10060714>.
- Frankland, P. W., & Josselyn, S. A. (2013). Memory and the single molecule. *Nature*, 493, 312– 313.
- Fukutani Y, Kobayashi K, Nakamura I, Watanabe K, Isaki K, Cairns NJ. Neurons, intracellular and extracellular neurofibrillary tangles in subdivisions of the hippocampal cortex in normal aging and Alzheimer’s disease. (1995)
- Frielingsdorf H , Thal L. J. , Pizzo D. P..” The septohippocampal cholinergic system and spatial working memory in the Morris water maze”. *Behav Brain Res* . 2006 Mar 15;168(1):37-46. doi: 10.1016/j.bbr.2005.10.008. Epub 2005 Dec 5.
- Gallagher M, Burwell R, Burchinal M. “Severity of spatial learning impairment in aging: development of a learning index for performance in the Morris water maze”. 1993.

- Gao, Xiang, Keun-Sik Kim, y Dexi Liu. 2007. “Nonviral Gene Delivery:What We know and What is next”. The APPS Journal 9 (1);1 E92-104. <https://doi.org/10.1208/aapsj09011009>.
- Garcia AD, Doan N. B., Imura T., Bush TG, Sofroniew M. V. “GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain”*Nat Neuroscience*. . 2004 Nov;7(11):1233-41. doi: 10.1038/nn1340. Epub 2004 Oct 24.
- Genis, Laura, David Davila, Silvia Fernandez, Andra Pozo-Rodrigalvarez, Ricardo Martinez-Murillo, y Ignacio Torres-Aleman. 2014. “Astrocytes Require insulin-like Growth Factor I to protect Neurons against Oxidative Injury”. *F1000Research* 3:28.<https://doi.org/10.12688/f1000research.3-28.v2>.
- Gilbert, P. E. & Kesner, R. P. Role of the rodent hippocampus in paired-associate learning involving associations between a stimulus and a spatial location. *Behav Neurosci* **116**, 63-71 (2002)
- Glasgow J. N., Everts M., Curriel D. T., 2006. “Transductional targeting of adenovirus vectors for gene therapy”
- Gogoleva V. S, Drutskaya M, S. & Atretkhany K, S, N. The role of microglia in the homeostasis of the Central Nervous System and Neuroinflammation. *Molecular Biology* 53. 696-703 (2019).
- Gold AE, Kesner RP. The role of the CA3 subregion of the dorsal hippocampus in spatial pattern completion in the rat. *Hippocampus* 2005;15:808–14.
- Gomez-Isla T., De Calihnon A. y Hyman BT. 2008. “Neuropathology of Alzheimer's Disease”. *Handbook of Clinical Neurology* 89: 233-43. [https://doi.org/10.1016/S0072-9752\(07\)01222-5](https://doi.org/10.1016/S0072-9752(07)01222-5).
- Goodrich-Hunsaker NJ, Hunsaker MR, Kesner RP. The interactions and dissociations of the dorsal hippocampus subregions: how the dentate gyrus, CA3, and CA1 process spatial information. *Behav Neurosci* 2008;122:16
- Gorgman AM. Neuronal cell death in neurodegenerative disease: recurring themes around protein handling. *J Cell Mol Med*. 2008 Dec; 12 (6A):2263-80. Review.-
- Goncalves JT, Schafer ST, Gage FH. Adult Neurogenesis in the Hippocampus:From Stem Cells to Behavior. *Cell*. 2016 Nov 3;167(4):897-914.
- Gould, E., Tanapat, P., McEwen, B.S., Flugge, G., Fuchs, E., 1998. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys are diminished by stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 3168–3171.
- Gould, E., Vail, N., Wagers, M., & Gross, C. G. (2001). Adult-generated hippocampal and neocortical neurons in macaques have a transient existence. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America, 98, 10910–10917.
doi:10.1073/pnas.181354698

- Goshen, I. y col.. Dynamics of retrieval strategies for remote memories. *Cell* **147**, 678-689, doi:10.1016/j.cell.2011.09.033 (2011).
- Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 2002 Jul 19;297 (5580):353-6.
- Heine, V.M., Maslam, S., Joels, M., Lucassen, P.J., 2004a. Prominent decline of newborn cell proliferation, differentiation, and apoptosis in the aging dentate gyrus, in absence of an age-related hypothalamus–pituitary–adrenal axis activation. *Neurobiol. Aging* 25, 361–375.
- Henriette van Praag , Alejandro F Schinder, Brian R Christie, Nicolas Toni, Theo D Palmer, Fred H Gage."Functional neurogenesis in the adult hippocampus". *Nature*. 2002 Feb 28;415(6875):1030-4. doi: 10.1038/4151030a.
- Hereñu, C. B., C. Cristina, O. J. Rimoldi, D. Becu-Villalobos, V. Cambiaggi, E. L. Portiansky, y R. G. Goya. 2007."Restorative Effect of Insulin-like Growth Factor-I Gene Therapy in thr Hyppocampal of Senile Rats with Dopaminergic Dysfunction". *Gene Therapy* 14 (3): 237-45. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302870>.
- Hereñu CB, Sonnatag WE, Morel GR, Portiansky EL, Goya RG. The ependymal route for insulin-like growth factor-1 gene therapy in the brain. *Neuroscience*. 2009. 1633:442-447.
- Hidaka, C. E Milano, p. L. Leopold, J.M. Bergelson, N. R. Hachett, R. W. Finberg, T. J. Wickham, I. Kovsdi, P. Roelvink, y R. G. Crystal. 1999. "CAR-Dependent and CAR-Independent Pathways of Adenovirus Vector-Mediated Gene Transfer and Expression in Human Fibroblast ". *The Journal Of Clinical Investigation* 103 (4): 579-87.<https://doi.org/10.1172/JC5309>.
- Hyman BT, Van Hoesen GW, Damasio AR, Barnes CL. Alzheimer's disease: Cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science*. 1984 Sep 14;225(4667):1168-70.
- Hyman BT, Van Hoesen GW, Damasio AR, Barnes CL. Alzheimer's disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science*. 1984 Sep 14;225 (4667):1168-70.
- Hötting, K., & Röder, B. (2013). Beneficial effects of physical exercise on neuroplasticity and cognition. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. doi:10.1016/j.neubiorev.2013.04.005

- Jäkel S, Dimou L. “Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation” *Front Cell Neuroscience*. 2017 Feb 13;11:24. doi: 10.3389/fncel.2017.00024. eCollection 2017.
- Jones, D. T. M. M. Machulda, P. Vemuri, E.M. McDade, G. Zeng, M. L. Senjem, J. L. Gunter, y col 2011. “Age related Changes in the Default Mode Network Are More Advanced in Alzheimer Disease”. *Neurology* 77 (16):1524-31. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318233b33d>.
- Johansson, Per, Daniel Aberg, Jan-Ove Johansson, Niklas Mattsson, Oskar Hansson, Bo Ahren, Jorgen Isgaard, y col. 2013. “ Serum but Not Cerebrospinal Fluid Levels of Insulin-Like Growth Factor-I (IGF-I) and IGF-I Binding Protein-3 (IGFBP-3) Are increased in Alzheimer’s Disease”. *Psychoneuroendocrinology* 38 (9): 1729-37. <https://doi.org/10.1016/j.psyneumen.2013.02.006>.
- Juottonen K, Laakso MP, Insauti R, Lehtovirta M, Pitkanen A, Partanen K, Soininen H. Volumens of the entorhinal and perirhinal cortices in Alzheimer’s disease. *Neurobiol Aging*. 1998 Jan-Feb;19(1):15-22.
- Kalueff A. V., Pentti Tuohimaa. “The grooming analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: potential utility for neurobehavioural stress research”. *J Neurosci Methods* . 2005 Apr 30;143(2):169-77. doi: 10.1016/j.jneumeth.2004.10.001.
- Kandel E, Schwartz J, Jessel T. *Principales of neural science*. 4th Edition. Ed McGraw Hill. 2000.
- Kandel, E. R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* **294**, 1030-1038, doi:10.1126/science.1067020 (2001).
- Kathe C, Medina JH. Requirement of an Early Activation of BDNF/c-Fos Cascade in the Retrosplenial Cortex for the Persistence of a Long-lasting Aversive Memory. *Cereb Cortex*. 2017 Feb 1;27 (2):1060-1067.
- Kazanis Ilias, Margaret Giannakopoulou, Helen Philippidis, y Fotini Stylianopoulou. 2004. “Alteration in IGF-1, BDNF and NT-3 Levels Following experimental Brain Trauma and the Effect of IGF-1 Administration” *Experimental Neurology* 186 (2): 221-34. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2003.12.004>.
- Kealy J, Commins S. The rat perirhinal cortex: A Review of anatomy, physiology, plasticity, and function. *Prog Neurobiol*. 2011 Apr;93(4):522-48.
- Kempermann, G, S Jessberger, B Steiner, and G Kronenberg. 2004. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus”. *Trends Neurosci* 27(8):447-452. Retrieved. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieved&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15271491).

- Kheirbek MA, Klemenhagen KC, Sahay A, Hen R. Neurogenesis and generalization: a new approach to stratify and treat anxiety disorders. *Nat Neurosci* 2012;15:1613–20
- Kesner RP, [O Hopkins](#) R. "Mnemonic functions of the hippocampus: a comparison between animals and humans". Review. *Biol Psychol* . 2006 Jul;73(1):3-18. doi: 10.1016/j.biopsycho.2006.01.004.
- Kesner RP. A behavioral analysis of dentate gyrus function. *Prog Brain Res* 2007;163:567–76.
- Kesner, R. P. & Rolls, E. T. A computational theory of hippocampal function, and tests of the theory: new developments. *Neurosci Biobehav Rev* **48**, 92-147, doi:10.1016/j.neubiorev.2014.11.009 (2015).
- Kessels R P, de Haan E H , Kappelle L J , Postma A. "Varieties of human spatial memory: a meta-analysis on the effects of hippocampal lesions" *Brain Res Brain Res Rev* . 2001 Jul;35(3):295-303. doi: 10.1016/s0165-0173(01)00058-3..
- Krasnykh, V. N. , J. T. Douglas, y V. W. van Beusechem. 2000. Genetic Targeting of Adenoviral Vector". *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* a (5 Pt1): 391-405. <https://doi.org/10.1006/mthe.2000.0062>.
- Kriegstein, A. & Alvarez-Buylla, A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci* **32**, 149-184, doi:10.1146/annurev.neuro.051508.135600 (2009).
- Koehl, M., & Abrous, D. N. (2011). A new chapter in the field of memory: adult hippocampal neurogenesis. *European Journal of Neuroscience*, *33*, 1101–1114. doi:10.1111/j.1460-9568.2011.07609.x
- Kooijman, Ron, Sophie Sarre, Yvette Michotte, y Jacques De Keyser. 2009. Insulin-like Growth Factor I: A Potential Neuroprotective Compound for the Treatment of Acute Ischemic Stroke?" *Stroke* 40 (4): e83-88. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.528356>.
- Kronenberg G, Bick-Sander A, Bunk E, Wolf C, Ehniger D, Kempermann G. 2006. Physical exercise prevents age-related decline in precursor cell activity in the mouse dentate gyrus. *Neurobiol Aging* 27:1505–1513.
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H and Gage FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci*. 1996. 16:2027-2033.
- Kumar A, Singh A, Ekavali. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacol Rep* 2015 Ap; 67 (2):195-203.

- Kurz A, Pernecky R. Novel insight for the treatment of Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011 Mar 30;35 (2):373-9.
- LaFerla FM, Oddo S. Alzheimer's disease: Abeta, tau and synaptic dysfunction. *Trends Mol Med*. 2005 Apr; 11(4):170-6.
- Laron, Z. 2001." Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone" *Molecular Pathology* 54 (5):311-16.
- Lentz, Thomas B., Steven J., Gray y R. Jude Samulski. 2012." Viral vector for gene Delivery to the Central Nervous System". *Neurobiology of Disease* 48 (2): 179-88. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.1011.09.014>.
- Lichtenthaler SF, Haass C, Steiner H. Reulated intramembrane proteolysis lessons from amyloid precursors protein processing. *J Neurochem*. 2011 Jun; 117 (5):779-96.
- Lichtenwalner, R. J., M. E. Forbes, S. A. Bennett, C. D. Lynch, W. E. Sonntag, y D. R. Riddle. 2001. "Intracerebroventricular Infusion of Insulin-like Growth Factor-I Ameliorates the Age-Related Decline in Hippocampal Neurogenesis". *Neuroscience* 107 (4):603-13.
- Lledo, P.-M., Alonso, M., & Grubb, M. S. (2006). Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nature Reviews. Neuroscience*, 7(3), 179–93. doi:10.1038/nrn1867.
- Llorens-Martín M., Jurado-Arjona J, Avila J, Hernández F."Novel connection between newborn granule neurons and the hippocampal CA2 field" *Exp Neurol*. 2015 Jan;263:285-92. doi: 10.1016/j.expneurol.2014.10.021. Epub 2014 Nov 1.
- López OL, DeKosky ST. Neuropathology of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Rev Neurol*. 2003 Jul 16-31;37(2):155-63.
- Louissaint Jr., A., Rao, S., Leventhal, C., & Goldman, S. A. (2002). Coordinated Interaction of Neurogenesis and Angiogenesis in the Adult Songbird Brain. *Neuron*, 34(6), 945–960. doi:10.1016/S0896-6273(02)00722-5.
- Luine V. N. Bowman R. E. "Effects of chronic restraint stress and estradiol on open field activity, spatial memory, and monoaminergic neurotransmitters in ovariectomized rats". *Neuroscience*. . 2002;113(2):401-10. doi: 10.1016/s0306-4522(02)00156-2.
- Lynn M. Bekris, Chang-En Yu, Thomas D. Bird, and Debby W. Tsuang. Genetics of Alzheimer Disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol*. 2010 Dec; 23 (4):213-227.
- Lucassen, P.J., Meerlo, P., Naylor, A.S., van Dam, A.M., Dayer, A.G., Fuchs, E., Oomen, C.A., Czeh, B., 2010. Regulation of adult neurogenesis by stress, sleep disruption, exercise

and inflammation: implications for depression and antidepressant action. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 20, 1–17.

- Lucin, Kurt M., y Tony Wyss-Coray. 2009. “Immune Activation in Brain Aging and Neurodegeneration: Too much or too little?” *Neuron* 64 (1): 110-22.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.08.039>.
- Malenka, R. C. & Bear, M. F. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44, 5-21, doi:10.1016/j.neuron.2004.09.012 (2004).
- Markowska, A. L. M. Mooney, y W. E. Sonntag. 1998. “ Insulin-like Growth Factor-I Ameliorates Age-Related Behavioral Deficits”. *Neuroscience* 87 (3):559-69.
- Marks, J. L., D. porte, y D. G. Baskin. 1991. “Localization of type I Insulin-like Growth Factor Receptor Messenger RNA in the Adult Rat Brain by in situ Hybridization”. *Molecular Endocrinology* (Baltimore, Md.) 5 (8):1158-68.
<https://doi.org/10.1210/med-5-8-1158>.
- Martinez-Canabal, A., Akers, K. G., Josselyn, S. A., & Frankland, P. W. (2013). Age-Dependent Effects of Hippocampal Neurogenesis Suppression on Spatial Learning. *Hippocampus*, 23, 66–74. doi:10.1002/hipo.22054
- Mauch D. H., Nägler K., Pfrieder F W.”Glia-derived signals induce synapse formation in neurons of the rat central nervous system”. *J Physiol.* 2001 Jun 15;533(Pt 3):665-79. doi: 10.1111/j.1469-7793.2001.00665.x.
- Matt S. M. & Johnson R. W., Neuro-immune dysfunction during brain aging: New insight in microglial cell regulation. *Current opinion in Pharmacology* vol 26 96-101 (2016)
- Maviel T, Durkin TP, Menzaghi F, Bontempi B. Sites of neocortical reorganization critical for remote spatial memory. *Science.* 2004 Jul 2;305(5680):96-9. Erratum in: *Science.* 2004 Aug 13;305 (5686):946.
- Mayes, A., Montaldi, D. & Migo, E. Associative memory and the medial temporal lobes. *Trends Cogn Sci* 11, 126-135, doi:10.1016/j.tics.2006.12.003 (2007).
- Meyer-Franke A, Kaplan M. R., Pfrieder F. W., Barres B. A. “Characterization of the signaling interactions that promote the survival and growth of developing retinal ganglion cells in culture” *Neuron.* 1995 Oct;15(4):805-19. doi: 10.1016/0896-6273(95)90172-8.
- Miller, B. H. y A. C. 2001. “Alterations in Hypothalamic Insulin-like Growth Factor-I and Its Associations with Gonadotropin Releasing Hormone Neurones during Reproductive Development and Ageing”. *Journal of Neuroendocrinology* 13 (8): 728-36.

- Ming, G., & Song, H. (2005). Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annual Review of Neuroscience*, 28, 223–250. doi:10.1146/annurev.neuro.28.051804.101459
- Mishkin M, W A Suzuki, D G Gadian, F Vargha-Khadem. “Hierarchical organization of cognitive memory”. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Science*. 1997 Oct 29;352(1360):1461-7.
- Monje, M., & Dietrich, J. (2012). Cognitive side effects of cancer therapy demonstrate a functional role for adult neurogenesis. *Behavioural Brain Research*, 227(2), 376–379. doi:10.1016/j.bbr.2011.05.012
- Morris AM, Churchwell JC, Kesner RP, Gilbert PE. Selective lesions of the dentate gyrus produce disruptions in place learning for adjacent spatial locations. *Neurobiol Learn Mem* 2012;97:326–31
- Morgado Bernal I. Aprendizaje y memoria: conceptos, categorías y sistemas neurales. Viguera Editores, S. L. U 2015.
- Moscovitch M, Nadel L, Winocur G, Gilboa A, Rosenbaum RS. 2006. The cognitive neuroscience of remote episodic, semantic and spatial memory. *Curr Opin Neurobiol* 16:179–190.
- Myers CE, Scharfman HE. Pattern separation in the dentate gyrus: a role for the CA3 backprojection. *Hippocampus* 2011;21:1190–215
- Nai, Q., Li, S., Wang, S.-H., Liu, J., Lee, F. J. S., Frankland, P. W., & Liu, F. (2010). Uncoupling the D1-N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor complex promotes NMDA-dependent longterm potentiation and working memory. *Biological Psychiatry*, 67(3), 246–54. doi:10.1016/j.biopsych.2009.08.011
- Nakashiba, T., Cushman, J. D., Pelkey, K. A., Renaudineau, S., Buhl, D. L., McHugh, T. J., et al. (2012). Young dentate granule cells mediate pattern separation, whereas old granule cells facilitate pattern completion. *Cell*, 149, 188–201.
- Nakazawa K, McHugh TJ, Wilson MA, Tonegawa S. NMDA receptors, place cells and hippocampal spatial memory. *Nar Rev Neurosci*. 2004. 5(5):361-72.
- Nishida, F. G, R. Morel, C, B. Hereñu, J. I. Schwerdt, R. G. Goya, y E. L. Portiansky. 2011. “Restorative Effect of Intracerebroventricular Insulin-like Growth Factor Gene Therapy on Motor Performance in Aging Rats”. *Neuroscience* 177 (marzo):195-206. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.01.013>.
- Nishijima, Takeshi, Joaquin Piruz, Silvie Dufлот, Ana M. Fernandez, Gema Gaitan, Ulises Gomez-Pinedo, Jose M. Garcia Verdugo, y coll. 2010. “Neuronal Activity Drives Localized Blood-Brain-Barrier5r Transport of Serum Insulin-like Growth

Factor-I into the CNS". *Neuron* 67 (5): 834-46.

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.08.007>.

- Norden D. M., Godbout J. P. "Review: microglia of the aged brain: primed to be activated and resistant to regulation". *NeuroPathol Appl Neurobiol* 2013. Feb;39(1):19-34. doi: 10.1111/j.1365-2990.2012.01306.x.
- Nyberg, L., Kim, A. S., Habib, R., Levine, B. & Tulving, E. Consciousness of subjective time in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 22356-22359, doi:10.1073/pnas.1016823108(2010).
- Obakht M, Hoseini SM, Mortazavi P, Sohrabi I, Esmailzade B, Rahbar Rooshandel N, Omidzahir S. Neuropathological changes in brain cortex hippocampus in a rat model of Alzheimer's disease. *Iran Biomed J.* 2011; 15(1-2):51-8.
- Ocran, I., C. T. Parmelee. 1990."Characterization of Insulin-like Growth Factor Binding Proteins Produced in the Rat Central Nervous System". *Endocrinology* 127 (3): 1260-67. <https://doi.org/10.1210/endo-127-3-1260>.
- O'Keefe J, Nadel L. *The Hippocampus as a Cognitive Map*. Oxford: Oxford University Press; 1978.
- O'Kusky, I. R., P Ye, y A. J. D'Ercole. 2000. "Insulin-like Growth Factor-I promotes Neurogenesis and Synaptogenesis in the Hippocampal Dentate Gyrus during Postnatal Development". *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 20 (22): 8435-42.
- Oomen, C.A., Mayer, J.L., de Kloet, E.R., Joels, M., Lucassen, P.J., 2007. Brief treatment with the glucocorticoid receptor antagonist mifepristone normalizes the reduction in neurogenesis after chronic stress. *Eur. J. Neurosci.* 26, 3395–3401.
- Padurariu M., Ciobica A., Mavroudis I , Dimitrios Fotiou & Stavros Baloyannis. Hippocampal neuronal loss in the CA1 and CA3 areas of Alzheimer's disease patients.
- Pan, J.-X. y col. Diagnosis of major depressive disorder based on changes in multiple plasma neurotransmitters: a targeted metabolomics study. *Translational Psychiatry* 8, 130 (2018).
- Pannasch U, Rouach N. Emerging role for astroglial networks in information processing: from synapse to behavior. *Trends Neurosci.* 2013;36(7):405–17.
- Papp, PRAPP and Gallagher M, 1996. Preserved neuron number in the hippocampus of aged rats with spatial learning deficits.
- Papouin T. , Dunphy -J., Tolman M., Foley J. C., Haydon P. G." Astrocytic control of synaptic function". *Philos Trans R Soc Lond B Biol Science.* 2017 Mar 5;372(1715):20160154. doi: 10.1098/rstb.2016.0154.

- Pardo, Joaquin, Maia Uriarte, Gloria M. Console, Paula C. Reggiani, Tiago F. Outeiro, Gustavo R. Morel, y Rodolfo G. Goya. 2016.” Insulin-like Growth Factor-I Gene Therapy Increase Hippocampal Neurogenesis, Astrocyte Branching and Improves Spatial Memory in Female aging Rats”. *The European Journal of Neuroscience* 44 (4):2120-28 <https://doi.org/10.1111/ejn.13278>.
- Pardo, Joaquin, Martin C. Abba, Ezequiel Lacunza, Laetitia Francelle, Gustavo R. Morel, Tiago F. Outeiro, y Rodolfo G. Goya. 2017.” Identofication of a Conserved Gene Signature Associated with an Exacerbated Inflammatory Environment in the Hippocampus of Aging Rats”. *Hippocampus* 27 (4): 435-49 <https://doi.org/10.1002/hipo.22703>.
- Paredes MF, Sorrels SF, Cebrian-Silla A, Sandoval K, Qi D, Kelley KW, James D, Mayer S. Chang J, Auguste KI, Chang EF, Gutierrez Martin Aj, Kriegstein AR, Mathern GW, Oldham MC, Huang Ej, Garcia- Verdugo JM, Yang Z, Alvare-Buylla A (2018) Does adult neurogenesis persist in the humman hippocampus? *Cell stem Cell* 23:780-781.
- Pastalkova, E. y col. Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. *Science* 313, 1141-1144, doi:10.1126/science.1128657 (2006).
- Patil, Siddehesh D., David G. Rodhes, y Diana J. Burgess. 2005. “DNA-Based Therapeutics and DNA Delivery Systems: A Comprehensive Review” *The AAPS Journal* 7 (1): E61-77. <https://doi.org/10.1208/aapsj>.
- Pause, B. M. *et al.* Perspectives on episodic-like and episodic memory. *Front Behav Neurosci* 7, 33, doi:10.3389/fnbeh.2013.00033 (2013).
- Paxinos G, Watson C. *The Rat brain*. Sexta edición.
- Pereira, A. C., Huddleston, D. E., Brickman, A. M., Sosunov, A. a, Hen, R., McKhann, G. M. Small, S. a. (2007b). An in vivo correlate of exercise-induced neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(13), 5638–43. doi:10.1073/pnas.0611721104.
- Perl, D. P.. 2010. “Neuropathology of Alzheimer’s Disease. *The Mount Sinai Journal of Medicine*, New York 77 (1):32-42. <https://doi.org/10.1002/msj.20157>.
- Piatti VC, Esposito MS, Schinder AF. The timing of neuronal development in adult hippocampal neurogenesis. *Neuroscientist*. 2006. 12(6):463-8.
- Poddar, Jit, Munmun Pradhan, Gargi Ganguly y Sasanka Chakrabarti. 2018. “Biochemical Deficit and Cognitive Decline in Brain Aging: Intervention by Dietary Supplement”. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, abril. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2018.04.002>.

- Preston AR, Eichenbaum H. Interplay of hippocampus and prefrontal cortex in memory. *Curr Biol.* 2013 Sep 9;23(17):R764-73.
- Prickaerts J, Fahrig T, Blokland A. Cognitive performance and Biochemical markers in septum, hippocampus and striatum of rats after an i.c.v. injection of streptozotocin: a correlation analysis. *Behav Brain Res.* 1999 Jul; 102(1-2):73-88.
- Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 2010 Jan 28;362(4):329-44 *N Engl J Med.* 2011 Feb 10;364(6):588.
- Rao MS, Hattiangady B, Abdel-Rahman A, Stanley DP, Shetty AK. Newly born cells in the ageing dentate gyrus display normal migration, survival and neuronal fate choice but endure retarded early maturation. *Eur J Neurosci.* 2005 Jan; 21 (2): 464-76.
- Raty, Jani K., Hanna P. Lesch, Thomas Wirth, y Seppo Yla-Herttuala. 2008."Improving Safety of Gene therapy" *Current Drug Safety* 3 (1): 46-53.
- Reiman, E. M., y R. J. Castelli. 1999. "Alzheimer's Disease". *Mataritas* 31 (3): 185-200.
- Rinderknecht E, Zapf J., Humbel R E, Froesch E R 1978. "Nonsuppressible insulin-like activity (NSILA) from human serum: recent accomplishments and their physiologic implications".
- Rivera, Enrique J. Alison Goldin, Noah Fulmer, Rose Tavares, Jack R. Wands, y Suzanne M. de la Monte. 2005." Insulin and insulin-like Growth Factor Expression and Function Deteriorate with Progression of Alzheimer's Disease:Link to Brain Reductions in Acetylcholine". *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 8 (3): 247-68.
- Rodriguez SS, Schewerdt JI, Barbeito CG y cols.Hypothalamic insulin-like growth factor-I gene therapy prolongs estral cyclicity and protects ovarian structure in middle-age female rats. *Endocrinology.* 2013; 154:2166-73.
- Rompa-Barendregt J,J Jolles, W H Gispen. " ACTH-induced excessive grooming in the rat: the influence of environmental and motivational factors". *Horm Behav .* 1979 Feb;12(1):60-72. doi: 10.1016/0018-506x(79)90027-8.
- Rosenbaum, R. Shayna, Gordon Winocur, Malcolm A. Binns, y Morris Moscovitch. 2012 "Remote Spatial Memory in Aging: All is Not lost" *Frontiers in Aging Neuroscience* 4: 25.<https://doi.org/10.3389/fnagi.2012.00025>.
- Rozovsky I., Wei M., Morgan T. E., Finch C. E. "Reversible age impairments in neurite outgrowth by manipulations of astrocytic GFAP"*Neurobiol Aging.* 2005 May;26(5):705-15. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2004.06.009.
- Sahay, A., Wilson, D. A., & Hen, R. (2011). Pattern separation: A common function for new neurons in hippocampus and olfactory bulb. *Neuron*, 70, 582–588.

- Salkovic-Petrisic M Amyloid cascade Hypothesis: is it true for sporadic Alzheimer's disease? *Periodicum Biologorum*. 2008 VOL. 110, No 1, 17-25.
- Sehat Bitar, Tofiq A, Yingbo L, Trocmé E., Liljedahl U., Lagergren K., Olle Larsson O. 2010. "SUMOylation mediates the nuclear translocation and signaling of the IGF-1 receptor."
- Selkoe, D J. 1999. "Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. " *Nature* 399 (6738 Suppl):A23-31. Retrieved (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10392577).
- Squire LR, Levy DA, Hopkins RO. Impaired odor recognition memory in patients with hippocampal lesions. *Learn Mem*. 2004. (6):794-6
- Schaffer, David V., James T. Koerber, y Kwang-il Lim. 2008. Molecular Engineering of Viral Gene Delivery Vehicles". *Annual Review of Medical Engineering* 10: 169-94 <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.10.061807.160514>.
- Schloesser, R. J., Lehmann, M., Martinowich, K., Manji, H. K., & Herkenham, M. (2010). Environmental enrichment requires adult neurogenesis to facilitate the recovery from psychosocial stress. *Molecular Psychiatry*, 15(12), 1152–63. doi:10.1038/mp.2010.34.
- Shayakhmetov, Dmitry M., Andrea M. Eberly, Zong-Yi Li, y Andre Lieber. 2005. "Deletion of Penton RDG Motifs Affects the Efficiency of Both the Internationalization and the Endsone Escape of Viral Particles Containing Adenovirus Serotype 5 or 35 Fiber Knobs". *Journal of Virology* 79 (2): 1053-61 <https://doi.org/10.1128/JVI.79.2.1053-1061.2005>.
- Schinder AF, Gage FH. "A hypothesis about the role of adult neurogenesis in hippocampal function. " *Physiology (Bethesda)*. 2004. 19:253-61.
- Shors, T J, D A Townsend, M Zhao, Y Kozorovitskiy, and E Gould. 2002. "Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal dependent learning." *Hippocampus* 12(5):578-584. Retrieved (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12440573).
- Spruijt B. M., J A van Hooff, W H Gispen. "Ethology and neurobiology of grooming behavior" . *Physiol Rev*. . 1992 Jul;72(3):825-52. doi:10.1152/physrev.1992.72.3.825.
- Serrano-Pozo, Alberto, Mathew P. Frosch, zeliezer Masliah, y Bradley T Hyman. 2011."Neuropathological Alterations in Alzheimer disease" *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 1 (1): a006189. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006189>.

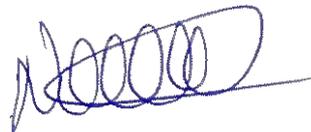
- Seth, Prem. 1999. *Adenoviruses: Basic Biology to Gene Therapy*. Austin, TX: R.G. Landes Co.
- Sierra A., Gootfried-Blackmore A. C, McEwen B. S, & Bulloch, K Microglia derived from Aging mice exhibit and altered Inflammatory Profile. doi:10.1002/glia20468.
- Simonato M, Bennet J, Boulis NM, Castro MG, Fink DJ, Goins WF, Gray SJ, Lowenstein PR, Vandenberghe LH, Wilson TJ, Wolfe JH, Glorioso JC. Progress in gene therapy for neurological disorders. *Nat Rev Neurol*. 2013 May; 9(5):277-91.
- Sorrels SF, Paredes MF, Velmeshev D, Herranz-Perez V, Sandoval K, Mayer S, Chang EF, Insausti R, Kriegsteing AR, Rubinstein JL, Garcia-Verdugo JM, Huang EJ, Alvarez-Buylla A (2019) Immature excitatory neurons develop during adolescence in the human amygdala. *Nat Commun* 10:2748.
- Spalding KL, Bermann o, Alkass K, Bernard S. Salehpour M., Huttner HB, Bostrom E, Westerlund I, Vial C, Buchholz BA, Possnert G, Mash DC , Druid H, DFrissen J (2013) Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell* 153:1219-1227.
- Squire, L. R. & Zola-Morgan, J. T. The cognitive neuroscience of human memory since H.M. *Annu Rev Neurosci* **34**, 259-288, doi:10.1146/annurev-neuro-061010-113720 (2011).
- Steen, Eric, Benjamin M. Terry, Enrique J. Rivera, Jennifer L. Cannon, Thomas R. Neely, Rose Tavares, X Julia Xu, Jack R. Wands, y Suzanne M. de la Monte. 2005.” Impaired Insulin and Insulin-like Growth Factor Expression and Signaling Mechanisms in Alzheimer’s Disease—Is This Type 3 Diabetes? “ *Journal of Alzheimer’s Disease:JAD* 7 (1): 63-80.
- Stogsdill JA, Ramirez J, Liu D, Kim YH, Baldwin KT, Enustun E, Ejikeme T, Ji R-R, Eroglu C. Astrocytic neuroligins control astrocyte morphogenesis and synaptogenesis. *Nature*. 2017;551:192.
- Streit, wolfgang J., Robert E Mark, y W. Sue T Griffin. 2004. “Microglia and Neuroinflammation: A Pathological Perspective”. *Journal of Neuroinflammation* 1 (1):14 <https://doi.org/10.111186/1742-2094-1-14>.
- Streit W. J. & Xue Q. S, The brain's aging Immune System. *Aging and disease*. Vol 1 (2010).
- Suh, H., Deng, W., & Gage, F. H. (2009). Signaling in adult neurogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 25, 253–75. doi:10.1146/annurev.cellbio.042308.113256.
- Tang, Y. P. y col., Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* **401**, 63-69, doi:10.1038/43432 (1999).

- Tarpy R. Aprendizaje: Teoria e investigacion contemporanea. Mexico. McGraw Hill 2000.
- Tatem, K. S. y col. Behavioral and Locomotor Measurements Using an Open Field Activity Monitoring System for Skeletal Muscle Diseases. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* e51785 (2014) doi:10.3791/51785.
- Tfilin M, E Sudai, A Merenlender, I Gispan, G Yadid, G Turgeman. “Mesenchymal stem cells increase hippocampal neurogenesis and counteract depressive-like behavior”. *Mol Psychiatry*. 2010 Dec;15(12):1164-75. doi: 10.1038/mp.2009.110. Epub 2009 Oct 27.
- Torras-Garcia M., David Costa-Miserachs, Margalida Coll-Andreu, Isabel Portell-Cortés. “ Decreased anxiety levels related to aging”. *Exp Brain Res*. . 2005 Jul;164(2):177-84. doi: 10.1007/s00221-005-2240-y. Epub 2005 Apr 26.
- Torres-Aleman, I. F. Naftolin, y R. J. Robbins. 1990. “Trophic Effects of Insulin-like Growth Factor-I on Fetal Rat Hypothalamic Cells in Culture”. *Neuroscience* 35 (3):601-8.
- Torres-Aleman, I., S. Pons, y F. F. Santos-Benito. 1992. “Survival of purkinje Cells in Cerebellar Cultures is Increased by Insulin-like Growth Factor I”. *The European Journal of Neuroscience* 4 (9):864-69.
- Torres Aleman, I. 1999. “Insulin-like Growth Factor as Mediators of Functional Plasticity in the Adult Brain”. *Hormone and Metabolic Research= Hormon-Und Stoffwechselforschung=Hormones Et Metabolisme* 31 (2-3)”114-19. <https://doi.org/10.1055/s-2007-978707>.
- Tronel, S., Fabre, A., Charrier, V., Oliet, S. H. R., Gage, F. H., & Abrous, D. N. (2010). Spatial learning sculpts the dendritic arbor of adult-born hippocampal neurons. *PNAS Neuroscience*, 1–6. doi:10.1073/pnas.0914613107.
- Trueba-Saiz, A, C Cavada, A M Fernandez, T Leon, D A Gonzalez, J Fortea Ormaechea, A Lleo, T Del Ser, A Nunez, y Torres-Aleman. 2013 “Loss of serum IGF-I input to the brain as an early biomarker of disease onset in Alzheimer mice”. *Translational Psychiatry* 3 (12): e330. <https://doi.org/10.1038/tp.2013.102>.
- Tulving, E. Episodic memory: from mind to brain. *Annu Rev Psychol* 53, 1-25, doi:10.1146/annurev.psych.53.100901.135114 (2002).
- Uda, M., Ishido, M., Kami, K., & Masuhara, M. (2006). Effects of chronic treadmill running on neurogenesis in the dentate gyrus of the hippocampus of adult rat. *Brain Research*, 1104(1), 64–72. doi:10.1016/j.brainres.2006.05.066.

- Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS, Barres BA. Control of synapse number by glia. *Science*. 2001 Jan 26;291(5504):657-61. PubMed PMID: 11158678. Epub 2001/02/07. eng.
- Van Cauter T, Camon J, Alvernhe A, Elduayen C, Sargolini F, Save E. Distinct roles of medial and lateral entorhinal cortex in spatial cognition. *Cereb Cortex*. 2013 Feb;23(2):451-9.
- Vann SD, Brown MW, Erichsen JT, Aggleton JP. For imaging reveals differential patterns of hippocampal and parahippocampal subfield activation in rats in response to different spatial memory tests. *J Neurosci*. 2000 Apr 1;20(7):2711-8.
- Van Strien, [N L M Cappaert](#), [M P Witter](#). "The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network". 2009. *Neuroscience*.
- Victor M & Agamolis D. "Amnesia due to Lesions Confined to the Hippocampus: A Clinical-Pathologic Study". *J Cogn Neurosci*. 1990 Summer;2(3):246-57. doi: 10.1162/jocn.1990.2.3.246
- Vogt BA, Peters A. Form and distribution of neurons in rat cingulate cortex: areas 32, 24 and 29. *J. Comp Neurol*. 1981 Feb; 195 (4): 603-25.
- von Bernhardin, R. Tichauer, J. E. & Eugenin, J. Aging-dependent changes of microglial cells and their relevance for neurodegenerative disorders. *Journal of Neurochemistry* 112, 1099-1114. (2010).
- Vorhees Charles V, William Michael T, "Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory". 2006
- Walsh, R. N. & Cummins, R. A. The open-field test: A critical review. *Psychological Bulletin* 83, 482-504 (1976).
- Wang JZ, Xia YY, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Abnormal Hyperphosphorylation of tau: sites, regulation, and molecular mechanism of neurofibrillary degeneration. *J Alzheimer Dis* 2013;33 Suppl 1:S123-39.
- Werther, G. A., H. Cheesman, y V Russo. 1993. "Olfactory Bulb Organ Culture is supported by Combined Insulin-like Growth Factor-I- and Basic Fibroblast Growth Factor". *Brain Research* 617 (2): 339-42.
- West MJ (1993). New stereological methods for counting neurons. *Neurobiol Aging* 2004 14: 275-278
- Westwood, Andrew J., Alexa Beiser, Charles DeCarli, Tamara B. Harris, Tai C. Chen, Xue-mei He, Ronenn Roubenoff, y col. 2014. "Insulin-like growth factor-I and

risk of Alzheimer dementia and brain atrophy”. *Neurology* 82 (18): 1613-19. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000382>.

- Witlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, Bear MF. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science*. 2006. 313 (5790): 1093-7.
- World Alzheimer Report 2018- The state of the Art of Dementia Research: New Frontiers.
- Yamaguchi F., T. Itano, O. Miyamoto, N.A. Janjua, T. Ohmoto, K. Hosokawa y o.Hatase. 1991.”Increase of extracelular insulin-like growth factor I (IGF-1) concentration following electrolytical lesion in rat hippocampus”. *Neuroscience Letters* 128 (2): 273-76. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(91\)90278-2](https://doi.org/10.1016/0304-3940(91)90278-2).
- Yasuno F, Imamura T, Hirono N, Ishii K, Saaki M, Ikejiri Y, Hashimoto M, Shimomura T, Yamashita H, Mori E. Age at onset and regional cerebral glucose metabolim in Alzheimer’s disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 1998 Mar-Apr;9(2):63-7.
- Yeh, P., y M. Perricaudet. 1997. “advances in Adenoviral Vectors: From Genetic Engineering to Their Biology”. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 11 (98):615-23.
- Yonelinas, A. P. y col. Effects of extensive temporal lobe damage or mild hypoxia on recollection and familiarity. *Nat Neurosci* 5, 1236-1241, doi:10.1038/nn961 (2002).
- Zemva, Johanna, y Markus Schubert. 2014. “ The Role of Neuronal Insulin/Insulin-like Growth Factor-1 Signaling for the Pathogenesis of Alzheimer’s Disease: Possible therapeutic Implications”. *CNS& Neurological Disorders Drug Target* 13 (2):322-37.
- Zola-Morgan S, Alvarez P. “The animal model of human amnesia: long-term memory impaired and short-term memory intact”. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Jun 7;91(12):5637-41. doi: 10.1073/pnas.91.12.5637.



Director de tesis: Dr. Gustavo Morel

Tesista: Noelia Lorena Illarreguy

