

Tesis Doctoral

Efectos del envejecimiento en la maduración e integración funcional de células granulares nacidas en el hipocampo adulto

Trincherro, Mariela Fernanda

2015-08-25

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Trincherro, Mariela Fernanda. (2015-08-25). Efectos del envejecimiento en la maduración e integración funcional de células granulares nacidas en el hipocampo adulto. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Trincherro, Mariela Fernanda. "Efectos del envejecimiento en la maduración e integración funcional de células granulares nacidas en el hipocampo adulto". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-08-25.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Efectos del envejecimiento en la maduración e integración funcional de células
granulares nacidas en el hipocampo adulto**

**Tesis presentada para optar al título de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires en el área CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Bioq. Mariela Fernanda Trincherro

Director de Tesis: Dr. Alejandro F. Schinder

Consejero de Estudios: Dr. Arturo Romano

Lugar de Trabajo: Fundación Instituto Leloir

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2015

Efectos del envejecimiento en la maduración e integración funcional de células granulares nacidas en el hipocampo adulto

Existen dos zonas neurogénicas en el cerebro adulto. Una es la zona subventricular que da origen a interneuronas del bulbo olfatorio y otra es la zona subgranular del giro dentado del hipocampo que genera células granulares (CGs). Las CGs nacidas en animales jóvenes se desarrollan y maduran por varias semanas, durante las cuales establecen conexiones funcionales aferentes y eferentes, adquiriendo la capacidad de procesar información. Para estudiar de qué manera este proceso es alterado por la edad se marcaron células progenitoras neurales (CPNs) de ratones de distintas edades con la proteína fluorescente verde y se analizó su morfología a distintos tiempos post-inyección, obteniéndose así las curvas de maduración para neuronas nacidas en distintos momentos. A partir de este análisis se pudo observar que a medida que avanza la edad, la tasa de maduración se ralentiza, notándose un mayor efecto en las primeras semanas del desarrollo de estas neuronas. A medida que el ratón envejece presenta niveles decrecientes de actividad basal del giro dentado que correlaciona con un desarrollo neuronal más lento. A pesar de dicho retraso, experimentos de electrofisiología demostraron que estas neuronas son capaces de integrar un estímulo excitatorio y disparar potenciales de acción de modo comparable a la de neuronas nacidas en el animal adulto joven.

Para comprender las bases del efecto del envejecimiento en el desarrollo neuronal se plantearon diversas manipulaciones experimentales para modular su tasa de maduración. En primer lugar se sometió a los ratones envejecidos a ejercicio voluntario y se observó que este tratamiento aceleró la maduración neuronal en animales envejecidos, con efectos más dramáticos en animales más viejos. Los niveles del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) se encuentran disminuidos en hipocampos de animales envejecidos, y los hipocampos de ratones corredores presentan mayores niveles de BDNF comparados con los sedentarios, indicando un posible efecto de este factor neurotrófico en el desarrollo neuronal de ratones envejecidos que realizan ejercicio físico. Para determinar si un efecto de aceleración de la maduración puede estar relacionado con la propia actividad eléctrica de las neuronas en desarrollo, se utilizó la transducción

retroviral de receptores sintéticos acoplados a proteína G para activarlas en forma intrínseca. Esta manipulación también revirtió el efecto provocado por el envejecimiento. Para investigar el rol del BDNF en el desarrollo neuronal de animales envejecidos se utilizó la técnica de ARN de interferencia (*short hairpin* ARN) para Lrig1, un modulador negativo de la vía de BDNF. Se observó un aumento en el efecto dendritogénico en las CGs que sobreexpresan el *shLrig1* en animales envejecidos. Esto sugiere un rol clave de la vía del BDNF en el desarrollo neuronal. Estos resultados demuestran que tanto la actividad del nicho neurogénico como la propia actividad de la célula cumplen un rol crucial en la tasa de maduración de las CGs.

Palabras claves: Envejecimiento, neurogénesis adulta, desarrollo neuronal, plasticidad neuronal, ejercicio voluntario, actividad neuronal, BDNF.

Effects of aging on the maturation and functional integration of adult-born dentate granule cells

Neurogenesis exists in two restricted zones in the adult brain: the subventricular zone that gives rise to interneurons in the olfactory bulb, and the subgranular zone of the dentate gyrus that generates granule cells (GCs). In the young adult brain, new GCs develop for several weeks. As they mature they establish functional afferent and efferent connections thus becoming able to process information. To study how aging affects this process, neural progenitor cells (NPCs) were labeled mice at different ages from young adult to middle age using retroviral expression of the green fluorescent protein (GFP), and their morphology was analyzed at different times post-injection. We observed that maturation rate decreases as mice get older. During the first weeks of neuronal development there is a striking delay in the maturation of GCs born in aging mice compared to young ones. Moreover, older mice present lower levels of basal activity in the dentate gyrus that correlate with a slower development of newborn GCs. Despite the observed delay in neuronal maturation in aging mice, electrophysiological recordings showed that 6-week-old neurons are able to integrate an excitatory stimulus and fire action potentials.

To better understand the effect of aging in neuronal development we used different approaches to modulate neuronal maturation in the aged hippocampus. First, voluntary exercise in the running wheel accelerated the rate of maturation in aging mice, with more dramatic effects in older animals. Brain-derived-neurotrophic factor (BDNF) levels in the hippocampus also decay as mice get older. However, the hippocampus of running mice presents higher levels of BDNF compared to sedentary mice. These results suggest a connection between BDNF levels and the effects of the running wheel.

To determine whether an acceleration of maturation is related to an increase in intrinsic electrical activity of developing neurons, NPCs were transduced with a retrovirus expressing G-coupled synthetic receptors to activate neurons. Chronic neuronal activation also prevented the effects of aging on the newborn GCs. In order to study the participation of BDNF in neuronal development in aging mice, shRNA was used against

Lrig1, a negative regulator of BDNF. An increase in dendritogenesis was observed in GCs overexpressing *shLrig1* in aging mice. This finding suggests a key role of BDNF signaling in the development of GCs born in aging mice. These results show that both the state of the neurogenic niche and the intrinsic activity of the cells have a crucial role in the rate of maturation of GCs.

Key Words: Aging, adult neurogenesis, neuronal development, neuronal plasticity, running, neuronal activity, BDNF.

Agradecimientos

A **Alejandro**, por haberme permitido el honor de hacer un doctorado en su laboratorio, por guiarme siempre con una sonrisa en momentos en los que el doctorado iba cuesta arriba, por haberme enseñado que los resultados siempre se pueden ver de varias formas, por no permitir que me desanime ante nada, por darme la oportunidad de viajar y formarme también afuera, por haber formado mi criterio, mi manera de hablar, de leer y de escribir en la ciencia, por no ser sólo un jefe, sino un líder y finalmente por demostrarme que un “jefe” puede ser poseedor de una extrema humanidad.

A mis padres, **Gustavo y Laura**, por haberme dado todas las herramientas necesarias para emprender este hermoso viaje a través del conocimiento. Por compartir discusiones científicas y por hacerme sentir que puedo lograr todo lo que me propongo.

A mi hermano, **Daniel**, que a pesar de ser un año y medio más chico que yo me llena de orgullo y me enseña todos los días que hay que trabajar duro para lograr lo que uno quiere.

A **Diego**, mi maridovio, mi pilar, mi mejor amigo, mi confidente, sin el cual no estaría donde estoy, gracias sobre todo por amarme incondicionalmente en este tiempo prolongado de tanta intensidad, por ayudarme con la tesis, por ver mis figuras, leer mis resultados y discusiones y ser tan paciente y amoroso conmigo.

A mis compañeros de laboratorio:

A **Jessi**, mi pequeña gigante, que me ayudó a levantar datos de esta tesis, con la cual compartí momentos de ciencia y de la cual me llevo una increíble amistad. Gracias por ayudarme a operar, a perfundir, a hacer inmunes, a ir al confocal, y por las risas provocadas en todos esos momentos.

A **Kari**, a quien conozco desde la infancia y porque el destino quiso unir nuestros caminos nos volvimos a cruzar. Gracias por aportar los datos de Calbindin de esta tesis, pero por sobre todo por tu inmensa alegría cotidiana y esa energía tan especial que tenés.

Al resto de mis compañeros que hacen el trabajo cotidiano tan ameno, a **Damy** por tu hermosa amistad todo este tiempo y también por la discusión de experimentos, a **Belu** por haberme iniciado en el fascinante mundo de la electrofisiología y por compartir momentos musicales, a **Silvio** con quien disfruté trabajar y a quien admiro como científico y ser humano, a **Diego** por también compartir experimentos y muchas pero muchas risas, a **Emi, Yang, Aye y Naty** por las enriquecedoras discusiones en los lab meetings y la compañía cotidiana.

A **Verito** de quien aprendí todo lo que sé y con quien me reencuentro en el comienzo de una etapa para las dos en la que sé que su presencia va a enriquecerme.

A **Mica y Dani** mis amigas vecinas, por compartir todo este camino tan de cerca conmigo. A todo el 308 por sus valiosos aportes científicos.

A **Yani y Gret** por su amistad constante aún en la lejanía y su apoyo en todo momento.

A mis amigas de otros laboratorios, **Gaby, Ivi, Elvi, Jules, Sofi, Sole e Ine** con quien compartimos ciencia, salidas y danza. Gracias por nunca dejarme sentir que estoy sola.

A **Martín** con quien inicié mi vida en las neurociencias a los 22 años y que me aportó valores científicos y humanos.

A **Cristina**, mi maestra de violín y de la vida, que siempre me insistió en que la neurociencia era mi camino y el violín el alimento de mi alma.

A mis amigos de la orquesta, **Isa, Lean, Emi y Her** por estar tan pendientes y preguntarme cada viernes si ya era doctora. Gracias por alegrarme todos los viernes con su desopilante humor y llenarme de todo su talento.

Indice

1.1 Introducción general	1
El hipocampo	1
Función del hipocampo	3
Neurogénesis adulta	6
Función de la neurogénesis adulta	8
Envejecimiento	9
Envejecimiento y neurogénesis	10
CAPITULO I: Tasa de maduración de neuronas nacidas en el en el hipocampo envejecido	
1. Introducción	13
2. Hipótesis y objetivos	16
3. Estrategia experimental	16
4. Materiales y métodos	17
5. Resultados	25
5.1 Efecto del envejecimiento en el árbol dendrítico de las células granulares	26
5.2 Efecto del envejecimiento en la densidad de espinas de las células granulares	29
5.3 Conectividad de las células granulares nacidas en animales envejecidos	32
5.4 Análisis de la actividad eléctrica de las células granulares del giro dentado de ratones envejecidos	33
6. Conclusión y discusión	34

CAPITULO II: Modulación de la tasa de maduración de neuronas nacidas en el hipocampo envejecido

1. Introducción	39
2. Hipótesis y objetivos	41
3. Estrategia experimental	41
4. Materiales y Métodos	43
5. Resultados	46
5.1 Efecto del ejercicio físico en células granulares nacidas en animales envejecidos	46
5.2 Efecto del aumento de la actividad intrínseca en las neuronas nacidas en animales envejecidos	54
5.3 Efecto de la modulación de la vía de BDNF en las neuronas nacidas en animales envejecidos	55
6. Conclusiones y discusión	57
Discusión general	62
Bibliografía	65

Abreviaturas

GFP: Proteína verde fluorescente

CGs: Células granulares

SGZ: Zona subgranular

LTP: Potenciación de largo termino

RFP Proteína roja fluorescente

RASSLs: Receptores activables solamente por ligandos sintéticos

PV: Parvalbúmina

mPP: Vía perforante medial

GCL: Capa granular

fEPSP: Potencial de campo postsináptico excitatorio

MML: capa molecular medial

2M: 2 meses

5M: 5 meses

8M: 8 meses

5MC: 5 meses corren

8MC: 8 meses corren

BDNF: Brain-derived neurotrophic factor

Introducción general

El hipocampo

El hipocampo (llamado así por Julius Caesar Aranzi en 1587 por su parecido al caballito de mar) se encuentra en el lóbulo temporal del cerebro (por debajo de la corteza) y forma parte del sistema límbico. La formación hipocampal está formada por el giro dentado y el hipocampo propiamente dicho conformado por cornu Ammonis (CA) 1, CA2, CA3, subiculum, presubiculum, parasubiculum y corteza entorrinal (Figura 1A).

El *input* neocortical hacia el giro dentado proviene de las capas superficiales de la corteza entorrinal y está constituido por la vía perforante (en particular desde la lámina II) (Ramón y Cajal, 1893). Esta conexión, como todas las conexiones entre células principales del circuito hipocampal, es excitatoria y unidireccional, es decir, el giro dentado no devuelve proyecciones a la corteza entorrinal. Las células granulares (CGs), células principales del giro dentado, se conectan con las células piramidales de CA3 a través de sus axones que conforman las fibras musgosas. Los axones de CA3 a su vez constituyen las fibras colaterales de Schaffer e inervan CA1. CA1 proyecta al subiculum y este hacia las capas profundas de la corteza entorrinal, en donde se cierra el circuito trisináptico hipocampal (Figura 1B).

Las aferencias provenientes de la corteza entorrinal impactan en los dos tercios externos de la capa molecular. Dependiendo del origen de los axones, porción lateral o medial de la corteza entorrinal, la vía perforante se divide en lateral o medial respectivamente. Las fibras originadas en la corteza entorrinal lateral inervan el tercio superficial de la capa molecular del giro dentado, mientras que las originadas en la zona medial terminan en el tercio medio de la capa molecular. El hipocampo también recibe aferencias del septum medial, el tálamo, la amígdala, la banda diagonal de Broca, del área tegmental ventral, de los núcleos del rafe y de las proyecciones comisurales provenientes del hipocampo contralateral.

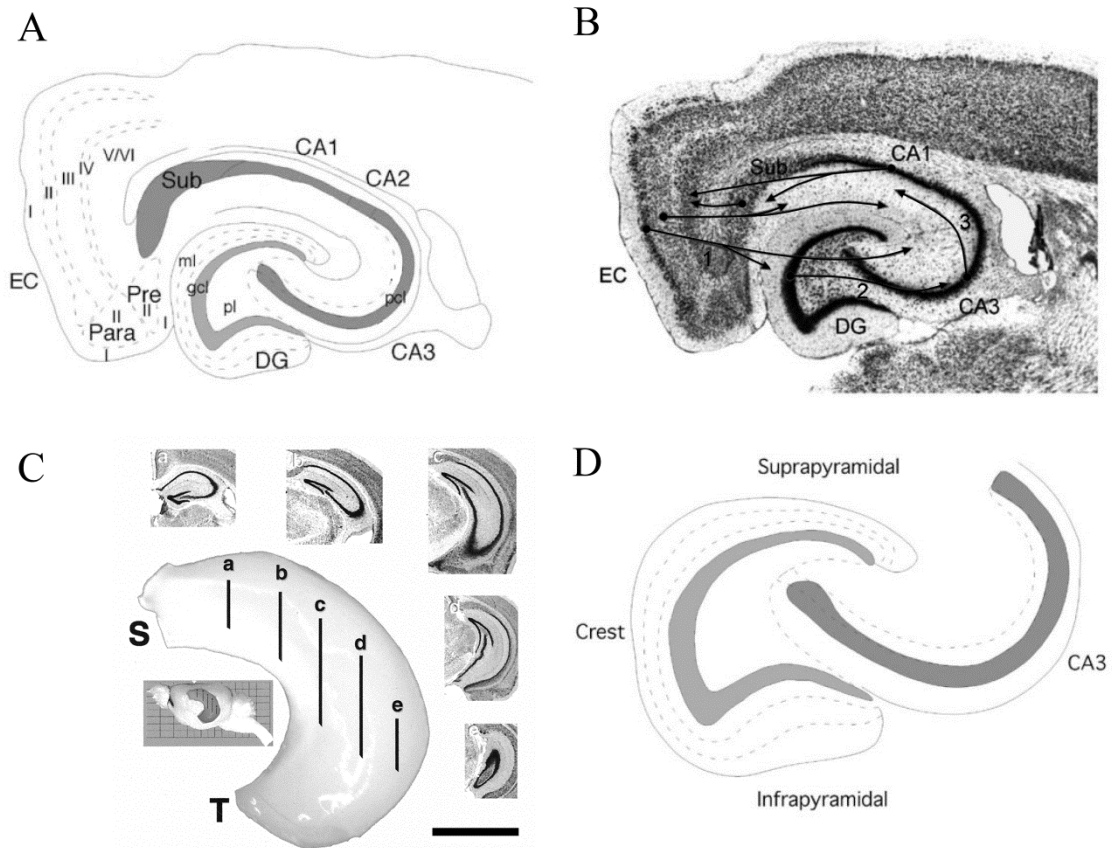


Figura 1: Arreglo estructural del hipocampo y sus conexiones. **A.** Esquema que ilustra la estructura laminar del giro dentado dividida en: capa molecular (ml), capa celular granular (gcl) y hilus o área polimórfica (pl). En el dibujo se observa la ubicación espacial de CA3 (con su capa principal de células piramidales: pcl), CA2 y CA1. La formación hipocampal también incluye al subiculum (Sub), presubiculum (Pre), parasubiculum (Para) y corteza entorrinal (CE), que posee distintas láminas marcadas con números romanos. **B.** Tinción de Nissl de la formación hipocampal. Las proyecciones de la CE (1). De las neuronas granulares salen las fibras musgosas (2) que pasan por el hilus e impactan en CA3 quien a través de las fibras colaterales de Schaffer (3) inervan CA1. Finalmente CA1 proyecta la CE cerrando así el loop del circuito hipocampal. **C.** Ejemplo de un hipocampo disectado de un cerebro de ratón orientado en forma septo(S)-temporal(T). Los insets (a-e) muestran tinciones de Nissl en donde se puede apreciar el hipocampo desde su forma más septal (a) hasta la más temporal (e). La escala para el hipocampo disectado es de 1mm. **D.** Esquema que muestra la capa suprapiramidal, la infrapiramidal y la cresta del giro dentado. (Figuras A, B y D adaptadas de Amaral et al, 2007, Figura C adaptada de Lu Lu et al, 2001)

En roedores, el hipocampo posee forma de “C” desde la línea media del cerebro hasta el lóbulo temporal, dando origen al llamado eje septo-temporal (Amaral and Witter, 1989). A medida que se avanza en cortes coronales desde la zona septal hacia la temporal el hipocampo va cambiando su forma y tamaño así como también sus aferencias y funcionalidad (Figura 1C). El polo septal recibe proyecciones neocorticales mientras que al hipocampo temporal impactan aferencias de núcleos subcorticales como la amígdala (Dolorfo and Amaral, 1998a, 1998b). El área

septal está asociada al rol del hipocampo en la navegación espacial (Moser et al., 1995) y la temporal al procesamiento de información emocional, lo cual muestra al hipocampo como una estructura de integración de datos provenientes de zonas anatómicamente distantes.

El giro dentado posee una estructura trilaminar: la capa molecular (libre de células) se encuentra cerca de la fisura del hipocampo. La capa celular granular es en donde residen las células principales del giro dentado, las neuronas granulares. Estas dos capas forman una “V” en el medio de la cual se encuentra la zona polimórfica o hilus. Cada porción de la “V” se llama capa suprapiramidal o infrapiramidal dependiendo de su posición con respecto al hilus, y su punta se llama cresta o vértice (Figura 1D).

Función del hipocampo

El hipocampo es necesario para codificar y evocar memoria declarativa (o explícita), un tipo de memoria de largo término que tiene que ver con el recuerdo de eventos, lugares y tiempos. La existencia de pacientes con lesiones hipocámpales de diverso grado dio lugar a la evidencia más fuerte que relaciona directamente al hipocampo humano con su rol en la memoria declarativa. Henry Gustav Molaison, más conocido como el paciente H.M., (1926–2008) sufría de convulsiones tan severas que su epilepsia se volvió intratable con anticonvulsivantes. A sus 29 años se sometió a una operación en la cual le extrajeron bilateralmente 8 cm del lóbulo temporal medial, incluyendo el hipocampo y la amígdala. Inmediatamente presentó amnesia anterógrada (incapacidad de generar memorias nuevas estables) y amnesia retrógrada parcial, (de memorias de hasta 3 años previos a la cirugía). Sin embargo los tests de inteligencia y de aprendizaje motor arrojaban resultados similares o incluso superiores que los previos a la operación (Scoville and Milner, 2000). A diferencia del paciente HM, el paciente EP carecía completamente del hipocampo y de la corteza entorrinal. Su performance en tareas de navegación espacial en su ambiente de la infancia fue de un 83% mientras que en un ambiente desconocido fue de un 0%. Esto significa que sin hipocampo el procesamiento espacial es normal, pero existe una incapacidad para adquirir nueva información espacial. Cuando se daña el lóbulo medial temporal, las memorias más recientes se ven afectadas mientras que las más lejanas se mantienen intactas. Esto expone al hipocampo como un sistema involucrado en la consolidación de la memoria, es decir, las memorias requieren del lóbulo medial temporal para formarse pero gradualmente se establecen en otras áreas del cerebro (Alvarez and

Squire, 1994). El estudio de estos pacientes lleva a la hipótesis de que el hipocampo posee un rol crucial en la codificación del espacio.

O'keefe (1978) encontró que ciertas neuronas en ratas, aumentaban su tasa de disparos en lugares determinados del espacio. Estas neuronas fueron llamadas "place cells" (células del lugar) y el espacio que codifica cada una de ellas es conocido como "place field" (campo receptivo). Estas neuronas se encuentran en el giro dentado, CA3 y CA1 (Figura 2A y B). Más aún, en la corteza entorrinal existen células llamadas de la grilla ("grid cells") cuyos campos receptivos forman una matriz hexagonal en todo el espacio posible en el que puede moverse el animal (Leutgeb et al., 2005) (Figura 2C y D). De esta forma, el hipocampo podría generar un mapa espacial a partir de la codificación de las células del lugar que le da información actualizada del espacio al animal e información de su propia posición en el mismo. Por otro lado en humanos se registraron alrededor de 300 neuronas en el lóbulo temporal medial y en el frontal mientras los individuos de estudio navegaban en una realidad virtual, y se evidenció que el hipocampo combina claves visuales y espaciales para generar un mapa espacial (Ekstrom et al., 2003).

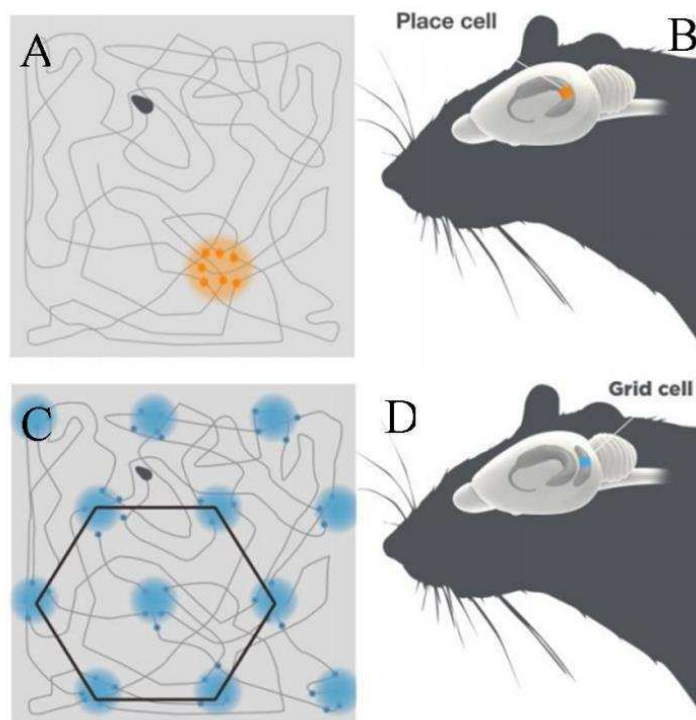


Figura 2. Células de lugar y células de la grilla. A. Las células de lugar aumentan su tasa de disparo (zona naranja) en una zona particular del ambiente recorrido por la ratita (la trayectoria se encuentra marcada con una línea negra). B. Las células de lugar se encuentran en el hipocampo. C. Las células de la grilla en cambio aumentan su tasa de disparo

en distintos puntos del ambiente disponible (zonas azules) formando un patrón hexagonal. **D.** Estas células se encuentran en la corteza entorrinal medial. (Ilustración de Karlen M. 2015, extraída de Science News.)

Hasta ahora solo se discutió el rol del hipocampo en cuanto al espacio, pero un evento determinado no sólo ocurre en un espacio dado sino también posee claves no espaciales y ocurre en una secuencia temporal concreta. El hipocampo genera un mapa cognitivo a partir de la representación de eventos temporalmente próximos en un determinado contexto espacial incluyendo información no espacial, así surge el concepto de codificación nodal (Eichenbaum et al., 1999) (Figura 3). Ratas con el hipocampo lesionado no son capaces de combinar claves espaciales y olfativas (lo cual les permitiría deducir cuándo está ocurriendo determinado evento) para generar un mapa cognitivo (Ergorul and Eichenbaum, 2004). La variante espacial está representada por variaciones en la locación del disparo de las células de lugar, mientras que las variantes no espaciales están representadas por la tasa de disparo. Esto lleva a una codificación espacial y no espacial de la experiencia en el hipocampo dándole al mismo un rol integrativo de la memoria episódica (Leutgeb et al., 2005).

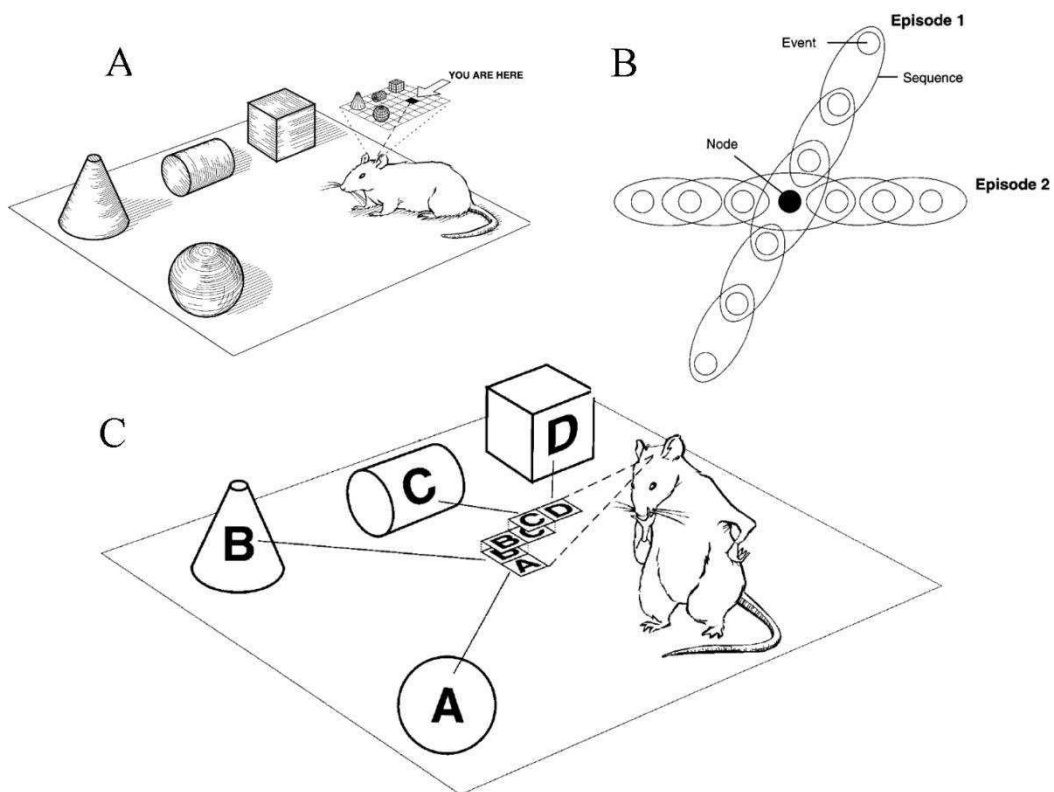


Figura 3. Representación espacial de acuerdo al concepto de “mapa cognitivo”. **A.** El hipocampo genera una representación a partir de claves ambientales. Los campos receptivos pueden considerarse como punteros del mapa en general. **B.** Codificación Nodal: muestra las interconexiones de la memoria espacial en el hipocampo. Los nodos se

cruzan entre distintos episodios comportamentales. C. Según la codificación nodal, además de adquirir una representación de A, B, C y D, existen representaciones nodales (línea de puntos) que codifican relaciones espaciales (AB, BC y CD) (Adaptado de Eichenbaum, 1999).

Neurogénesis adulta

La neurogénesis adulta es un ejemplo de cómo un dogma instaurado puede caer y dar lugar a una nueva idea capaz de revolucionar el campo científico. A partir de estudios de Ramón y Cajal el número de neuronas existentes en la adultez se creía fijo. En 1963, Altman inyectó ratas y gatos adultos con timidina tritiada y observó neuronas marcadas en el giro dentado del hipocampo (Altman, 1963). Más tarde, en 1984 el mismo experimento realizado en canarios, comprobó que la neurogénesis adulta también existía en aves (Paton and Nottebohm, 1984). Estos descubrimientos llevaron a un aumento en el interés por la neurogénesis adulta y varios grupos empezaron a estudiar y reforzar la idea de que nuevas neuronas eran agregadas al cerebro durante toda la vida. Hubo dos descubrimientos que confirmaron la neurogénesis en el hipocampo adulto humano. En 1998 a partir de pacientes tratados con el análogo de timidina, bromodeoxiuridina (BrdU), y análisis post-mortem se confirmó la neurogénesis en el hipocampo del humano adulto (Eriksson et al., 1998). Además durante la guerra fría los niveles de ^{14}C atmosférico aumentaron debido a pruebas nucleares. El ^{14}C fue tomado por las plantas en forma de CO_2 cuando hacen fotosíntesis, y a su vez los animales ingirieron esas plantas. El ^{14}C encontrado en un hombre que comió plantas y/o animales expuestos a ^{14}C , será reflejo entonces del ^{14}C atmosférico. Cuando las células de dichos individuos se dividieron incorporaron en el ADN ^{14}C el cual marca el momento del nacimiento de dicha célula. Analizando cerebros post-mortem de humanos que vivieron durante esa época se logró demostrar que en adultos se añaden 700 neuronas en el giro dentado, es decir, 1,75% por año (Spalding et al., 2013), lo cual se asemeja a lo que ocurre en el ratón. Esto da un impulso para entender en detalle el proceso de neurogénesis adulta humana.

El marcado de las neuronas nacidas en el adulto con retrovirus modificados genéticamente abrió un campo de estudio en el cual no sólo se pudo comprobar la existencia de la neurogénesis en el adulto, sino estudiar las neuronas nuevas y conocer sus propiedades y su integración al circuito existente (van Praag et al., 2002a).

Hoy se sabe que la neurogénesis en el adulto ocurre durante toda la vida en dos zonas restringidas del cerebro. La zona subventricular de los ventrículos laterales a partir de la cual

surgen células que luego de migrar por la vía migratoria rostral da origen a interneuronas del bulbo olfatorio (cabe aclarar que en el humano la neurogénesis en el bulbo olfatorio es menor al 1% (Spalding et al., 2013)), y la zona subgranular del giro dentado que genera las neuronas granulares. Las células progenitoras neurales (CPNs) presentes en estas regiones se dividen, se diferencian y migran para producir neuronas granulares funcionales que son capaces de integrarse al circuito, procesar información (Abrous et al., 2005; Lledo et al., 2006; Ming and Song, 2005; Overstreet-Wadiche and Westbrook, 2006; van Praag et al., 2002a) y que, una vez maduras, son indistinguibles de las nacidas en el desarrollo (Laplagne et al., 2007) (Figura 4).

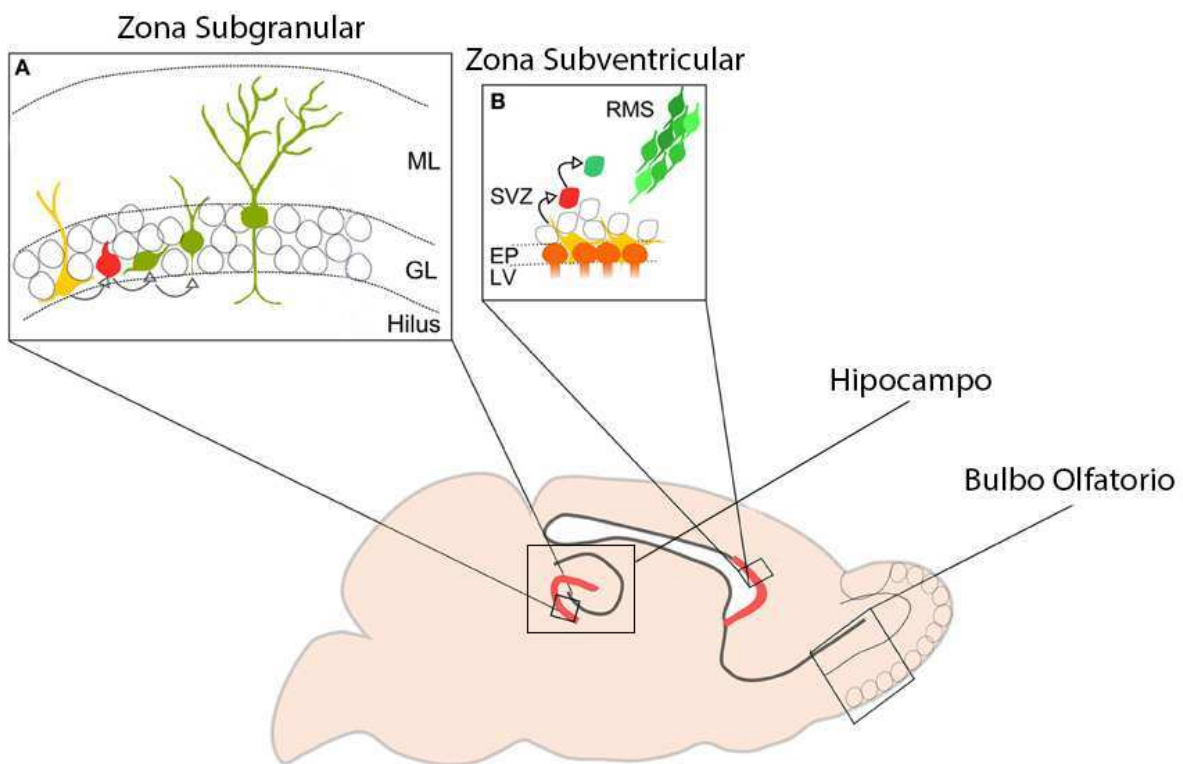


Figura 4. Neurogénesis en el ratón adulto. Se muestran en rojo las dos zonas neurogénicas. **A.** En la zona subgranular del giro dentado del hipocampo, las células tipo I (amarillo) se dividen y dan origen a las tipo II (rojas) que se diferencian en neuronas inmaduras (verdes). Estas neuronas maduran a células granulares y se integran en el circuito. **B.** La zona subventricular contiene progenitores de tipo B (amarillo) cerca de las células del epéndima (naranja). Estas se dividen y dan las células tipo C (rojas) que a su vez dan lugar a neuroblastos. Estos migran por la vía migratoria rostral (RMS) hacia el bulbo olfatorio dando origen a neuronas nuevas. (Adaptado de Pallotto, 2014).

Una pregunta inmediata que surge es qué impacto pueden tener las neuronas generadas en la adultez en cuanto a la función cerebral y en el comportamiento del animal. En ratas se produce un 3-6% de neuronas respecto de la población total de neuronas granulares cada mes (equivalente a unas 4500 neuronas por día) (Cameron and McKay, 2001; Tashiro et al., 2007).

Luego de 2 décadas de estudio de la neurogénesis adulta, este fenómeno abrió un campo fascinante para ser estudiado en profundidad y sobre todo tratar de entender para qué sirve la neurogénesis en el adulto, porqué sólo ocurre en ciertas zonas del cerebro y qué potencial terapéutico puede tener.

Función de la neurogénesis adulta

La función de la neurogénesis adulta continúa siendo un motivo fascinante de estudio. Es innegable que está implicada en procesos de aprendizaje y memoria. Los primeros indicios se observaron en aves. Aquellas especies con más experiencia en almacenar comida muestran hipocampos de mayor tamaño, mayor número de células nuevas y menor número de células apoptóticas en el hipocampo, y no así en otras áreas del cerebro (Clayton and Krebs, 1994). También se descubrió que ratones sometidos a ambiente enriquecido y a ejercicio voluntario mejoran su performance en el aprendizaje (Kempermann et al., 1997). El grupo de Fred Gage comprobó que el ejercicio aumenta en número de neuronas nacidas en el giro dentado adulto así como la plasticidad y el aprendizaje (van Praag et al., 1999). Luego un descubrimiento clave se llevó a cabo. Mediante la utilización de retrovirus se pudo analizar morfológica y electrofisiológicamente las neuronas nuevas y se concluyó que las mismas son funcionales, que son capaces de disparar potenciales de acción y de recibir aferentes sinápticos al igual que las neuronas nacidas en el desarrollo (van Praag et al., 2002a).

Por otro lado otros grupos intentaron reducir la cantidad de neuronas nuevas para observar el efecto que esto tenía en tareas de aprendizaje y memoria. En un principio los métodos para disminuir la neurogénesis no eran específicos (drogas antimetabólicas e irradiación). Reducir la neurogénesis con acetato de metilazometanol (MAM) produjo déficits en tareas dependientes de hipocampo relacionadas a la memoria del miedo (Shors et al., 2002). Por otra parte, ratas irradiadas no son capaces de resolver tareas de reconocimiento de lugar (dependiente de hipocampo), pero si son capaces de realizar tareas de reconocimiento de objetos (independiente de hipocampo) (Madsen et al., 2003). Dado que con las herramientas existentes se tornaba difícil obtener resultados claros y libres de efectos técnicos colaterales, se fueron desarrollaron técnicas más limpias para depletar la neurogénesis en el adulto. Fue la aparición de ratones genéticamente modificados lo que posibilitó estudiar la función de la neurogénesis adulta con mayor

especificidad. En un estudio reciente se logró un ratón transgénico en el cual se puede inducir selectivamente la muerte de precursores neurales sobreexpresando una proteína pro-apoptótica (Bax). Estos ratones fueron sometidos al Morris Water Maze, un test de aprendizaje espacial, y se observó que si bien podían resolver la tarea cuando la demanda cognitiva era baja (lugar de comienzo del test fijo todos los días), no podían hacerlo cuando la demanda cognitiva era mayor (lugar de comienzo del test variable) (Dupret et al., 2008). De esta forma quedó demostrado que la neurogénesis adulta es necesaria para resolver paradigmas de aprendizaje espacial que requieran una determinada demanda cognitiva que implique procesamiento de información y claves espaciales.

Queda claro de todo lo expuesto, que la neurogénesis adulta cumple un rol fundamental en la formación y consolidación de memorias espaciales dependientes de hipocampo. Esto denota la importancia del entendimiento de los procesos involucrados en la neurogénesis adulta de los mamíferos.

Envejecimiento

El envejecimiento lleva a una disminución en las funciones cognitivas del cerebro que podría ser en parte debido a un cambio en la plasticidad neuronal o alteraciones celulares que afecten mecanismos de plasticidad. Si bien el cerebro en su totalidad sufre cambios debido al envejecimiento, el hipocampo ha sido objeto de importantes estudios de alteraciones anatómicas causadas por el envejecimiento que puedan explicar al menos en parte los déficits causados en la memoria al llegar a edades avanzadas. Como se expuso anteriormente el hipocampo cumple un rol crucial en la memoria declarativa y la navegación espacial. Ratas viejas muestran déficits en la memoria en tareas de aprendizaje espacial como el Barnes Maze (Barnes, 1979) y el Morris Water Maze (Gage et al., 1984). El envejecimiento también influye en la habilidad que poseen los humanos de navegar en un espacio determinado (Burns, 1999; Driscoll et al., 2005; Moffat et al., 2006; Uttl and Graf, 1993). Se han encontrado además correlaciones entre el tamaño del hipocampo y la performance de tareas espaciales realizadas en laberintos virtuales (Head and Isom, 2010). Los individuos viejos que presentaron una mejor performance (recorrieron menores distancias hasta la meta) eran aquellos que presentaban un mayor volumen hipocampal.

Estudios de fMRI muestran que el metabolismo en el giro dentado de ratones, monos y humanos envejecidos se encuentra disminuido (Small). Más aún se encontró que existe un menor volumen de materia blanca en la vía perforante, el input más importante del hipocampo proveniente de la corteza entorrinal (Yassa et al., 2010). En concordancia con este hallazgo en roedores hay una pérdida de sinapsis axoespinosas de la proyección de la lámina II de la corteza entorrinal a las células granulares (Geinisman et al., 1992) y una disminución de la inmunoreactividad de sinaptofisina en CA3 en el envejecimiento (Smith et al., 2000). Esto implica una pérdida de conexiones del circuito hipocampal.

Por otro lado el número de células principales del hipocampo (células granulares y células piramidales de CA1 y CA3) se mantiene conservado en humanos (West), primates (Keuker et al.) y roedores (Gallagher et al., 1996).

Si bien la funcionalidad del hipocampo está preservada en el envejecimiento, existen cambios fisiológicos que sumados a los cambios anatómicos previamente expuestos, pueden correlacionar con los déficits observados en las tareas de memoria y aprendizaje espacial.

La potenciación de largo término (LTP: long term potentiation) es un mecanismo por el cual aumenta la fuerza sináptica luego de actividad eléctrica correlacionada entre dos neuronas. Dado que se ha propuesto que las memorias se codificarían cambiando la fuerza sináptica (Fazeli et al., 1993) el LTP ha sido propuesto como uno de los principales mecanismos celulares que subyace al aprendizaje y la memoria. Los animales viejos poseen LTP intacto cuando se utilizan protocolos de estimulación de alta frecuencia para provocarlo, pero muestran déficits en su inducción si la intensidad del estímulo es menor. Esto correlaciona con déficits en el aprendizaje de tareas de memoria espacial (Gage et al., 1984; Shen et al., 1997).

Envejecimiento y neurogénesis

Durante el envejecimiento disminuye la proliferación de progenitores neurales en el hipocampo, hay menor diferenciación neuronal (una mayor proporción de las células se diferencia a astrocitos) y menor supervivencia en comparación con animales jóvenes (Bondolfi et al., 2004; Heine et al., 2004; Kuhn et al., 1996). “Sex-determining region” Y-box2 (Sox2) es un factor de transcripción que se encuentra en células madre embrionales y se utiliza como marcador de

células madre neuronales (CMNs). Se encontró que el número de CMNs Sox⁺ no disminuye en ratas envejecidas (Hattiangady and Shetty, 2008). Esto sugiere que la disminución de la neurogénesis se debe a un aumento en la quiescencia de las CMNs y no a una disminución en el número de las mismas. Como se discutió previamente, durante el envejecimiento los animales disminuyen su performance en tareas de aprendizaje espacial. Sin embargo, si estos corren, los niveles de neurogénesis se recuperan hasta un 50% (en forma transiente) y su performance en la adquisición y retención de la memoria mejoran (van Praag et al., 2005). Esto lleva a plantear la *hipótesis de que una disminución en la neurogénesis podría explicar en parte la disminución en la plasticidad circuital y por ende los déficits cognitivos observados.*

Además de factores intrínsecos, existen otros extrínsecos que también afectan al nicho donde ocurre la neurogénesis. Los niveles basales de glucocorticoides se encuentran incrementados en roedores y humanos envejecidos (Stein-Behrens and Sapolsky, 1992) y esto podría llevar a una disminución de las capacidades cognitivas (Raskind et al., 1994). Se sabe también que la inflamación afecta negativamente la neurogénesis. La microglía extraída de animales envejecidos, luego de ser activada, libera una mayor cantidad de factores pro inflamatorios, como por ejemplo el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y la interleuquina 6 (IL-6) comparada con microglía extraída de animales jóvenes (Lucin and Wyss-Coray, 2009). El estrés oxidativo también posee un impacto negativo en la neurogénesis y dado que la microglía de animales envejecidos contiene niveles menores de glutatión, ésta es menos efectiva en atenuar el estrés oxidativo comparado con lo que sucede en animales jóvenes (Njie et al., 2012). Además, los niveles de factores neurotróficos como BDNF (brain-derived neurotrophic factor) y NGF (nerve growth factor) también están disminuidos en el animal envejecido (Erickson et al., 2010). En cuanto a la vasculatura, con la edad los vasos sanguíneos se vuelven más permeables a proteínas que podrían desencadenar respuestas inflamatorias (Lee et al., 2012). Este podría ser un parámetro más que explique la disminución en la neurogénesis, a pesar de que las neuronas nacidas en animales viejos logran alcanzar parámetros morfológicos que implican igual madurez que neuronas completamente maduras nacidas en un animal adulto joven (Ben Abdallah et al., 2010; Morgenstern et al., 2008).

Comprender los cambios en la plasticidad neuronal asociados a la edad es de suma importancia. Dado que la neurogénesis disminuye paralelamente a la performance en tareas de memoria y aprendizaje, cabe preguntarse si el desarrollo e integración funcional de las neuronas

generadas en animales viejos es tan eficaz como en los adultos jóvenes. Por otra parte, es importante determinar si la modulación de este proceso obedece a reglas o parámetros similares en animales de diversa edad. En esta tesis se plantea entonces realizar un estudio descriptivo del desarrollo neuronal en ratones adultos hasta edad avanzada (Capítulo I), y por otro lado dilucidar los mecanismos que modulan este proceso en diferentes edades (Capítulo II).

Capítulo I: Tasa de maduración de neuronas nacidas en el hipocampo envejecido

1. Introducción

1.1 Maduración de las neuronas nuevas en el hipocampo joven

Los progenitores neurales del hipocampo joven proliferan, se diferencian, sobreviven, migran y maduran hasta integrarse en el circuito hipocampal (Abrous et al., 2005; Lepousez et al., 2015; Lledo et al., 2006; Ming and Song, 2005; Overstreet-Wadiche and Westbrook, 2006; van Praag et al., 2002b) (Figura 5). El estudio morfológico a partir del marcado indeleble de las neuronas nuevas con la proteína verde fluorescente (GFP) permitió el estudio detallado de la secuencia temporal de la maduración de las células granulares (CGs) (Espósito et al., 2005; Ge et al., 2006a; van Praag et al., 2002a; Zhao et al., 2006). En los primeros días la célula adquiere el fenotipo neuronal, pero sus potenciales de acción son pequeños. Expresan marcadores de neurona inmadura como doblecortina (DCX) y se encuentran localizadas en la zona subgranular (SGZ). No poseen aferentes sinápticos y tienen una resistencia de membrana alta, indicativa de la baja densidad de canales iónicos. Alrededor de la primera semana ya poseen algunas dendritas que llegan a la capa molecular interna y se encuentran ubicadas en forma paralela a la capa granular. En este estadio los únicos aferentes funcionales son terminales GABAérgicos sobre las dendritas, y en ese momento del desarrollo neuronal GABA es despolarizante debido a la elevada concentración de Cl^- intracelular (Ambrogini et al., 2004; Espósito et al., 2005; Ge et al., 2006a; Karten et al., 2006; Overstreet Wadiche et al., 2005).

Entre la segunda y la cuarta semana GABA cambia a hiperpolarizante y las dendritas ya comienzan a disponerse en forma perpendicular a la capa granular. A los 21 días ya reciben aferentes glutamatérgicos y disparan potenciales de acción más maduros. En este estadio se observa un incremento de la sinaptogénesis (Tashiro et al., 2006). A los 28 días las CGs tienen menor umbral para la potenciación de largo término (LTP), (Ge et al., 2007; Schmidt-Hieber et al., 2004), y son más fácilmente activables (Marin-Burgin et al., 2012). La maduración finaliza aproximadamente a los 2 meses. En cuanto a la eferencia, los axones impactan en CA3 a los 10 días y su longitud aumenta rápidamente entre las 2 y 8 semanas.

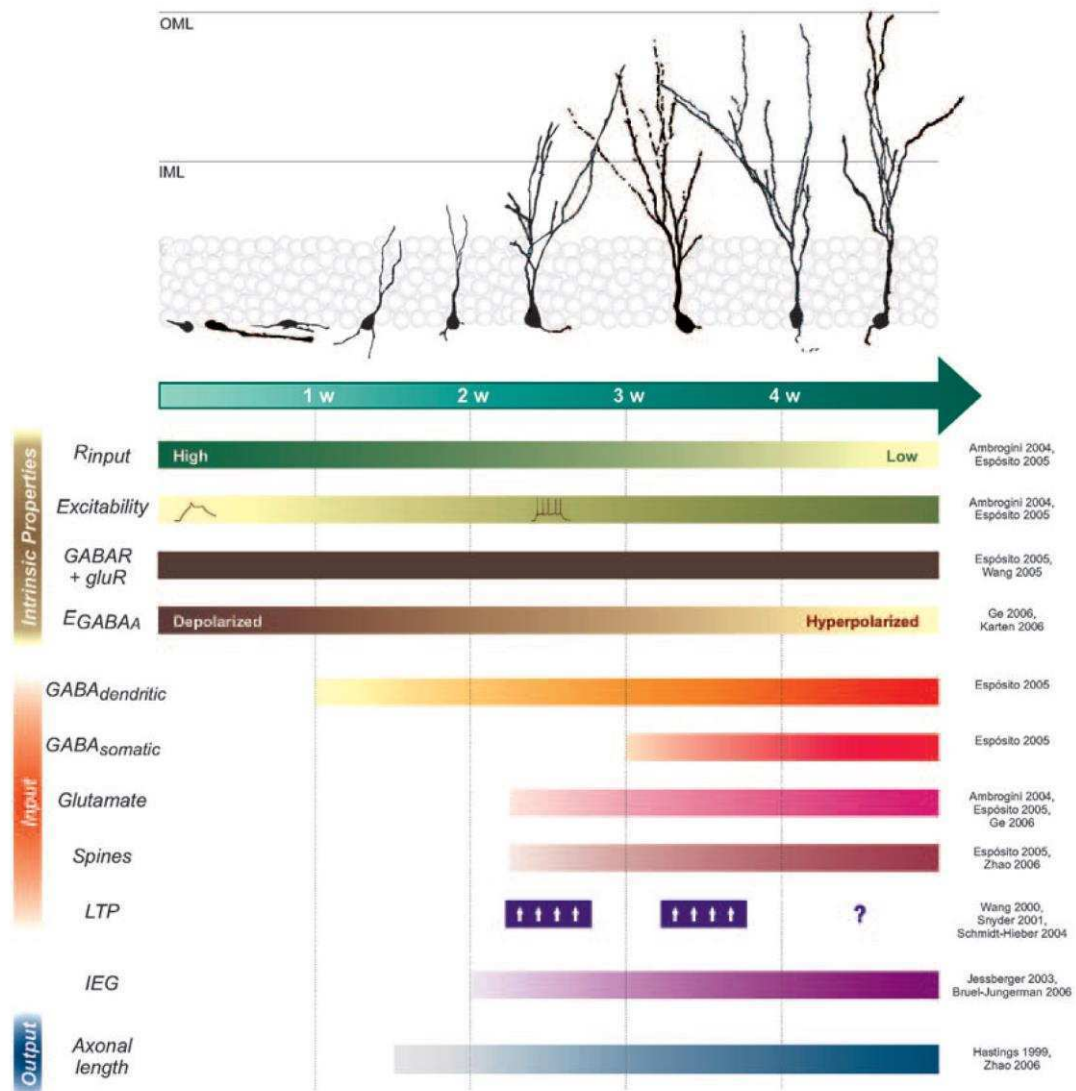


Figura 5. Secuencia de maduración de las CGs. Ejemplos de neuronas marcadas con GFP a distintos tiempos post inyección. A la izquierda se describen las propiedades intrínsecas, el *input* y el *output* neuronal. Las barras y la intensidad de su color indican la aparición de la propiedad determinada. (OML: capa molecular externa, IML: capa molecular interna, R_i : resistencia de *input*, E_{GABA} : potencial de reversión de GABA, IEG: gen temprano inmediato). (Extraído de Piatti y col. 2006).

La tasa de maduración neuronal puede modificarse según las condiciones fisiológicas o patológicas del nicho. Un ejemplo de esto es el desarrollo de las neuronas nacidas durante la neurogenesis neonatal (Overstreet-Wadiche et al., 2006a) que ocurre más rápidamente que la neurogénesis en un hipocampo joven. Sus propiedades morfológicas y funcionales son similares a aquellas neuronas nacidas en el animal joven (Laplagne et al., 2007) pero forman espinas y generan un árbol dendrítico maduro más rápido (Zhao et al., 2006). Si bien como ya se expuso en

la introducción se sabe que la neurogénesis disminuye con la edad (Kempermann et al., 1998; Kuhn et al., 1996; McDonald and Wojtowicz, 2005; Morgenstern et al., 2008; Rao et al., 2005), la velocidad con la que maduran las neuronas nacidas en un hipocampo envejecido es desconocida.

2. Hipótesis y objetivos

El desarrollo neuronal en estadios postnatales ocurre con mayor rapidez que en el ratón adulto (Espósito et al., 2005; Overstreet-Wadiche et al., 2006a; Zhao et al., 2006) entonces es posible que a medida que envejezca el animal, la neurogénesis ocurra con una velocidad cada vez menor. La actividad cumple un rol crucial para el desarrollo neuronal. En el polo septal del hipocampo la actividad eléctrica es mayor que en la temporal y este aumento de la actividad correlaciona con una aceleración de la maduración en esta región (Piatti et al., 2011). Dado que la neurogénesis se encuentra disminuida en el envejecimiento, cabe preguntarse si esto puede generar alteraciones en el patrón de desarrollo e integración funcional de estas neuronas. De todo lo expuesto anteriormente se desprende la primera hipótesis de esta tesis.

El envejecimiento afecta el desarrollo neuronal de las CGs nacidas en el adulto

El primer objetivo de esta tesis doctoral fue caracterizar la progresión temporal del desarrollo de CGs nacidas en ratones adultos y de mediana edad. Se estudiaron además los estadios intermedios de maduración de estas neuronas para conocer si a lo largo de su desarrollo presentan características que les permitan ser distintas y funcionalmente relevantes a las nacidas en el desarrollo o en un hipocampo joven. Más aún se investigó si las neuronas nacidas en el hipocampo adulto logran integrarse al circuito al igual que las nacidas en un hipocampo joven.

3. Estrategia experimental

Para estudiar las CGs nuevas se utilizó un retrovirus que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) con un promotor fuerte CAG, que es capaz de integrarse al genoma de las células en división (van Praag et al., 2002a) (Figura 6). De esta forma, al inyectarlo utilizando cirugía estereotáxica en el giro dentado de ratones C57BL/6J de 2M, 5M y 8M, sólo aquellas células que se estaban dividiendo al momento de la operación quedaron marcadas en forma indeleble. Así a distintos tiempos post-inyección pudieron identificarse CGs de determinada edad

para ser analizadas tanto desde el punto de vista morfológico (por inmunofluorescencia) como funcional (por electrofisiología).

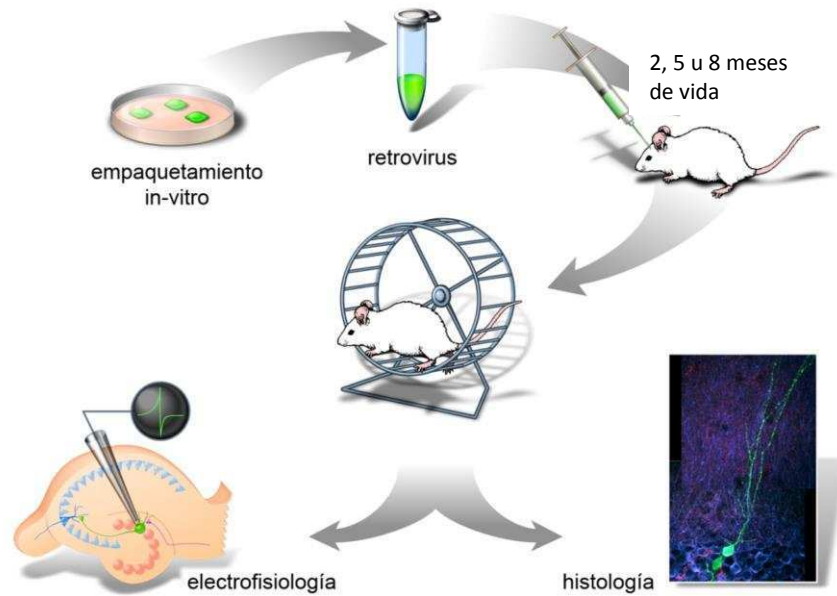


Figura 6. Estrategia de marcado de neuronas nuevas. El retrovirus que codifica para GFP es producido a partir de células en cultivo y alicotado. En una cirugía estereotáxica se inyecta en el giro dentado. Los ratones corren antes y después de la operación para elevar la neurogénesis y aumentar así el número de neuronas marcadas (van Praag 1999). Luego se realizó histología para analizar en detalle la morfología de estas neuronas o electrofisiología para analizar su conectividad con el circuito hipocampal.

De esta forma se puede analizar cómo es la secuencia de maduración analizando parámetros morfológicos específicos de madurez y conectividad y si las neuronas están integradas correctamente al circuito mediante experimentos de loose patch.

4. Materiales y métodos

4.1. Producción de vectores virales

Se utilizó un retrovirus desarrollado por Chunmei Zhao y cedido gentilmente para su uso en nuestro laboratorio. Es un retrovirus no replicativo derivado del Moloney murine leukemia virus (MMLV) que expresa la proteína GFP bajo el promotor CAG, promotor constitutivo fuerte (Laplagne et al., 2006). Para la producción del virus se contó con células HEK 293T establemente

transfectadas usando polietilenimina (PEI) con un plásmido conteniendo el gen que codifica para la proteína de la cápside. Dicho plásmido se produjo en condiciones libres de endotoxina a partir de bacterias E. coli XL1-blue transformadas, siguiendo un protocolo comercial modificado del protocolo de lisis alcalina (Maxiprep endotoxin-free, Qiagen).

Las células HEK 293T fueron cultivadas en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, Invitrogen) suplementado con: 10 % de suero fetal bovino, glutamina (200 mM) y gentamicina (50 mg/ml). Luego de 48 hs el sobrenadante conteniendo el virus fue cosechado, filtrado y concentrado mediante dos rondas de ultracentrifugación. Finalmente, el virus fue resuspendido en DPBS estéril y conservado a -80° C hasta el momento de su uso. El título en general fue de 10⁵ partículas/μl. La producción del virus en diferentes momentos fue realizada por M. Veggeti, M.F. Trincherro o N. Beltramone.

4.2. Animales y cirugía estereotáxica

Teniendo en cuenta las distintas etapas en la vida del ratón se consideró un grupo de ratones jóvenes a aquellos de 2 meses de vida (2M), ratones de edad adulta a ratones de 5 meses (5M) y ratones de edad mediana a aquellos de 8 meses de vida (8M) (Figura 7). Se utilizaron ratones C57Bl6/J hembra en jaulas grupales de 3 a 6 animales habituados a la sala de bioterio desde una semana previa a los experimentos. Tres días antes de la cirugía se colocaron ruedas en las jaulas para correr (una rueda cada dos individuos). Las ruedas permanecieron en las jaulas hasta el día siguiente de la operación.

Para la cirugía, los ratones se anestesiaron en forma intraperitoneal con 150 μg de ketamina y 15 μg de xilazina por gramo de peso corporal. Una vez anestesiado cada ratón fue colocado en el aparato estereotáxico (Stoelting), donde se procedió a marcar bajo lupa las coordenadas de la inyección. Todas las inyecciones fueron realizadas en el giro dentado del hemisferio derecho utilizando las siguientes coordenadas tomadas desde el Bregma: -2 mm antero-posterior, -1.5 mm lateral y -1.9 mm ventral. En la coordenada marcada se afinó el hueso craneal con un taladro y se levantó el hueso restante realizando un troquelado con una aguja fina, logrando no dañar la corteza y sin retirar la duramadre.

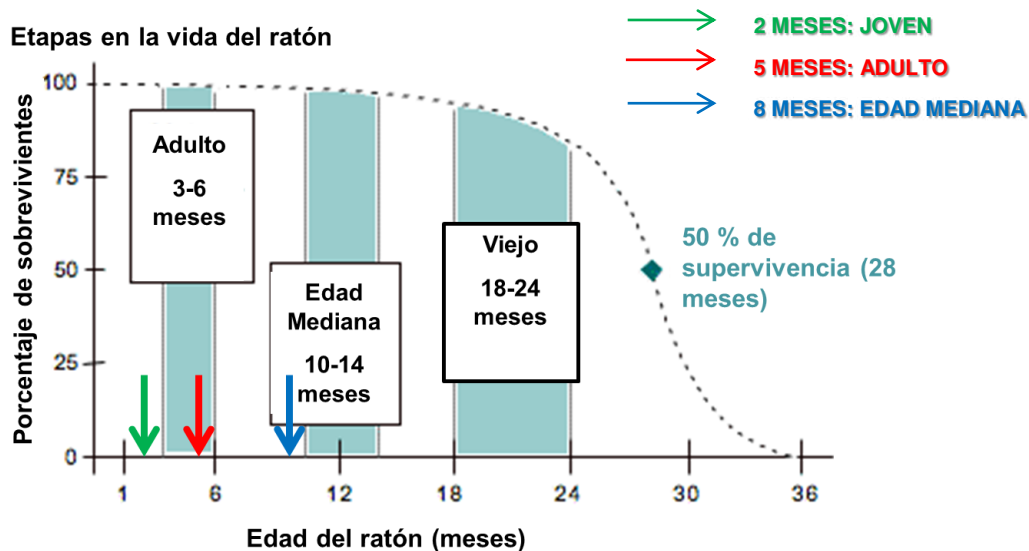


Figura 7. Etapas en la vida del ratón C57BL/6J. (Adaptado de la figura 20-3: Flurkey K, Curren JM, Harrison DE. 2007. The Mouse in Aging Research. In The Mouse in Biomedical Research 2nd Edition. Fox JG, et al, editors. Laboratorio de medicina animal (Elsevier), Burlington, MA. pp. 637–672.). Flecha verde: grupo experimental joven (2M); flecha roja: grupo experimental adulto (5M); flecha azul: grupo experimental de edad mediana (8M).

Luego, se inyectó 1 µl de virus para el grupo 2M y 1.5 µl de virus para el grupo de 5M y 8M en 10 minutos utilizando un capilar calibrado (Drummond Scientific) estirado por calor con un puller. La piel del animal se cerró utilizando cemento ultrarrápido en base a cianocrilato “La Gotita”. Finalmente se observó la recuperación adecuada de los animales.

4.3. Perfusión e inmunofluorescencia

Los animales fueron anestesiados con la misma composición de la anestesia utilizada para la cirugía. La perfusión cardíaca se realizó por el ventrículo izquierdo durante 20 minutos, primero con 50 ml de solución fisiológica con heparina (2.5 U/ml) y luego con 100 ml de paraformaldehído (PFA) 4 % en buffer fosfato (PB) 0.1 M pH 7.2 que fue preparado inmediatamente antes de la perfusión. Al finalizar, se removió el cerebro y se lo dejó en PFA 4 % a 4°C. Al día siguiente, los cerebros fijados se pasaron a sacarosa 30 % en PB 0.1 M y se mantuvieron a 4° C hasta que descendieron al fondo del tubo. Luego, fueron cortados en rodajas coronales de 60 µm en un micrótopo Leica. Por último, las rodajas se mantuvieron a -20° C en solución criopreservadora (3 volúmenes de glicerol, 3 volúmenes de etilenglicol y 4 volúmenes de PB 0.2 M) hasta el momento de realizarse la inmunofluorescencias.

Las inmunofluorescencias fueron realizadas con la técnica de “free-floating” (rodajas libres en solución) utilizando secciones del polo septal del hipocampo. El protocolo consistió en:

Elección de las secciones en PB 0.1 M,

- 1) 3 lavados de 5 minutos con TBS 1 X con agitación a temperatura ambiente (Tamb).
- 2) 1 hora de bloqueo (Solución de bloqueo: TBS 1 X con 3 % de suero de burro y 0.25 % de Tritón X-100) con agitación a Tamb.
- 3) 48 horas de incubación con los anticuerpos primarios con agitación a 4º C.
- 4) 2 lavados de 15 minutos con TBS 1 X con agitación a Tamb.
- 5) 15 minutos de bloqueo con agitación a Tamb.
- 6) 2 horas de incubación con los anticuerpos secundarios con agitación a Tamb.
- 7) 3 lavados de 5 minutos con TBS 1 X con agitación a Tamb.
- 8) 10 minutos de incubación con DAPI para contratinción fluorescente.
- 9) 4 lavados de 5 minutos con TBS 1 X con agitación a Tamb.
- 10) Montaje con PVA-DABCO.
- 11) Secado de los portaobjetos en oscuridad por una noche a Tamb.
- 12) Secado de los portaobjetos en oscuridad por 2 a 5 días a 4º C. Los portaobjetos permanecen a 4º C hasta completar los análisis debido a una mayor estabilidad de los fluoróforos.

Todos los anticuerpos fueron aplicados en la solución de bloqueo. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: NeuN, anticuerpo monoclonal de ratón (1:50, FH Gage); GFP, anticuerpo policlonal de conejo conjugado con Alexa 543 (1:500, Invitrogen); ARC (policlonal de conejo 1:500). Se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios (1:250, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA): ratón Cy5 (cyanine 5) y conejo Cy3 todos hechos en burro. Las soluciones utilizadas fueron las siguientes:

- TBS 10 X, 132.2 g de Trizma HCl, 19.4 g de Trizma Base y 90 g de NaCl, pH 7.5;
- DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Sigma D9542), 3 µl del stock en 30 ml de TBS 1 X (Stock en -20º C: 1 mg/ml, 3 mM) y

- PVA-DABCO, 2.5 % de polyvinyl alcohol (PVA) y 2.5 % de 1.4 diazabicyclo (2,2,2) octane (DABCO) (Sigma D2522) con glicerol y 0.2 M de Tris-HCL pH 8/ 8.5.

4.5. Microscopía confocal y análisis de imágenes

En la presente tesis se presentan los resultados obtenidos en el hipocampo septal, determinando los límites de su extensión con las coordenadas del Atlas del cerebro de ratón de Paxinos & Franklin, como lo realizado en Piatti y col 2011.

En los análisis se incluyeron sólo las células GFP localizadas en la zona subgranular (SGZ) (10 μm) y en la GCL. La morfología neuronal se analizó mediante una reconstrucción tridimensional, la cual es un set de 64 proyecciones panorámicas en los ejes X-Y a diferentes ángulos. Las proyecciones involucraron diferente número de planos ópticos (1 μm de espesor c/u) de acuerdo al tamaño de la neurona analizada. Cada grupo de planos ópticos se adquirió con 1 μm de intervalo entre planos, salvo para los detalles de espinas dendríticas (0.7 μm), con el objetivo de 40 X y aumentos digitales variables de acuerdo a la morfología. La primera proyección del eje Z en los ejes X-Y a 0° fue la que se utilizó para las mediciones morfológicas de árbol dendrítico, así como para todos los ejemplos de proyecciones en las figuras. Todo el análisis de imágenes se realizó utilizando el software Zeiss LSM Image Browser.

4.6. Análisis de ARC en la capa granular del giro dentado de ratones envejecidos

La proporción de neuronas granulares expresando ARC del giro dentado se calculó de la siguiente manera:

1) A partir de inmunofluorescencias para ARC y NeuN se midió el área de la capa granular del giro dentado (NeuN) de secciones coronales. Se obtuvo así una densidad de células ARC. Las mediciones se realizaron en las proyecciones del eje Z en X-Y de Z-stacks adquiridos a 20 X con un aumento digital de 0.7. Los planos fueron de 3 μm de espesor con un espaciado de 2.5 μm .

2) Se obtuvo la densidad de células NeuN⁺ en muestras de la capa granular supra e infrapiramidal de la región dorsal de secciones coronales, en planos ópticos únicos de 1 μm .

3) Se relativizó la densidad de células ARC⁺ a la densidad de células NeuN⁺ (en μm), y se graficó la expresión de ARC cada 100 neuronas granulares (NeuN⁺).

4.7. Electrofisiología: Preparación de las rodajas agudas de hipocampo

Los ratones fueron anestesiados y decapitados 42 días después de la inyección retroviral para reconocer las neuronas nacidas en el adulto. Los cerebros fueron removidos y colocados en una solución fría de composición (mM): 110 colina-Cl⁻; 2.5 KCl, 2.0 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 0.5 CaCl₂, 7 MgCl₂, 20 dextrosa, 1.3 Na⁺-ascorbato, 0.6 Na⁺-piruvato y 4 ácido kinurénico. Se aisló el hipocampo derecho y cortó la región dorsal en rebanadas de 400 μm de espesor con un vibrátomo Leica VT1200S. Las rodajas fueron transferidas a una cámara con una solución de líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF) de composición (mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 2 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 1.3 MgCl₂, 1.3 Na⁺-ascorbato, 3.1 Na⁺-piruvato y 10 dextrosa (315 mOsm). Las rodajas fueron burbujeadas con carbógeno (95% O₂/5% CO₂) y mantenidas a 30° C por 1 hora antes de realizar los registros. Para los registros, se mantuvieron las rodajas en un sistema de perfusión de ACSF burbujeada con carbógeno, a temperatura ambiente, bajo un microscopio de contraste de interferencia diferencial (DIC) Olympus BX61WI montado con una cámara digital.

Los registros fueron obtenidos usando el amplificador Axopatch 200B o Multiclamp700B (Molecular Devices), digitalizados mediante una tarjeta Digidata 1440A (Molecular Devices) y adquiridos a 10-20 kHz en una computadora personal usando el software pClamp10 (Molecular Devices). El análisis se realizó utilizando el software pClamp10. Las estimulaciones de la vía perforante medial (*medial perforant path* : mPP) fueron realizadas con electrodos monopolares de acero (Frederick Haer Company) controlados mediante un estimulador Master 8 (A.M.P.I., TTLs de duración 200 μs) a través de un estimulador Iso-Flex (A.M.P.I.).

Para los registros electrofisiológicos se utilizaron microelectrodos estirados de vidrio de borosilicato (KG-33, King Precision). Los registros de campo se realizaron utilizando microelectrodos de 4–5 MΩ con solución de NaCl 3 M. Para los registros en modo loose-patch se utilizaron microelectrodos de 5–7 MΩ conteniendo ACSF.

La intensidad del estímulo es proporcional al número de axones mPP activados. La pendiente del potencial de campo postsináptico excitatorio (fEPSP) aumenta linealmente con el número de axones activados (Pouille et al. 2009). Por lo tanto, para poder comparar la fuerza del estímulo entre rodajas, se evaluó la fuerza de estimulación como el porcentaje de la pendiente del

fEPSP (Figura 8). Para registrar el fEPSP y el pop-spike en respuesta al estímulo de la mPP, al comenzar los experimentos se colocó un electrodo de registro de campo en la capa granular. Se estimuló a intensidades crecientes con 2 pulsos distanciados a 50 ms (de 0 a 160 μ A, cada 10 μ A). Tomando la respuesta al primer pulso, se realizaron curvas del porcentaje de la pendiente del fEPSP y del porcentaje del pop spike en función de la corriente de estimulación, considerando como 100% la respuesta a la intensidad que evoca la máxima amplitud del pop spike (Figura 8B y C). La respuesta al segundo pulso se utilizó para verificar que hubiera depresión del pop spike estimulando la mPP al rango de intensidades utilizado en el experimento, dado que la mPP, a diferencia de la LPP, deprime en respuesta a 20 Hz (McNaughton, 1980).

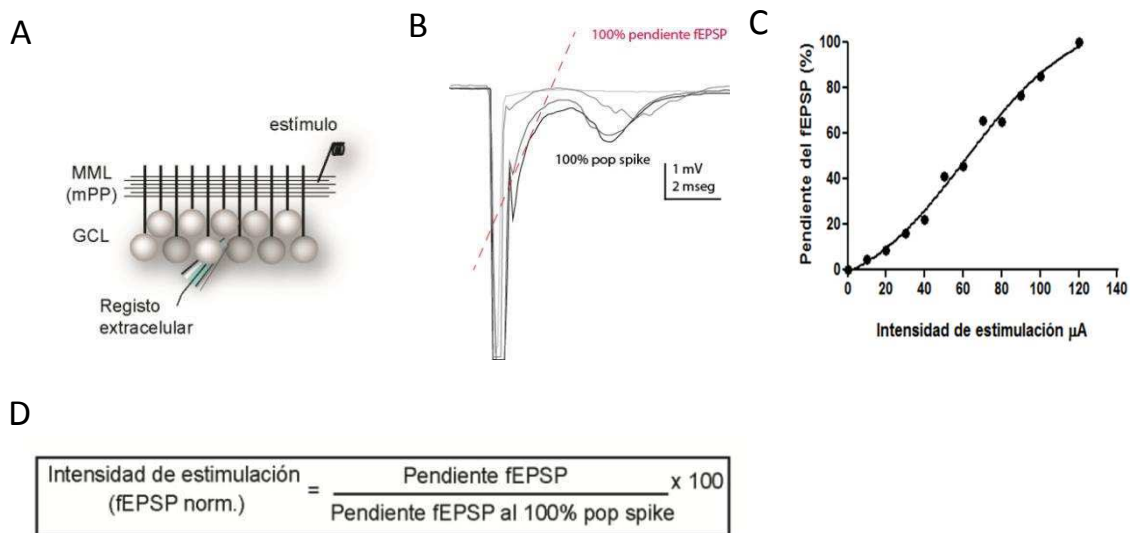


Figura 8. Calibración del estímulo de los experimentos de loose-patch. **A.** Esquema del registro. El electrodo de estimulación se coloca en la capa molecular medial (MML) para estimular la vía perforante medial (mPP), es decir, los axones provenientes de la corteza entorrinal medial. Un electrodo de registro extracelular se coloca en la capa de CGs (GCL) para registrar la variación del potencial de campo en respuesta a la estimulación. **B.** Trazos de potencial de campo en respuesta a la estimulación a intensidades crecientes. El pico hacia abajo corresponde al population spike (pop spike). Se señala la pendiente de potencial de campo postsináptico excitatorio (fEPSP) en rojo. El 100% de la pendiente del fEPSP corresponde al pop spike máximo (100%). **C.** La intensidad del estímulo en μ A se relativiza al porcentaje de la pendiente del fEPSP con la finalidad de poder realizar comparaciones entre rodajas. Ejemplo de dicha relación en un experimento con ajuste de una función sigmoidea. **D.** Fórmula de cálculo de la intensidad de estimulación en los experimentos de loose-patch.

4.8. Análisis Estadístico

Todos los datos de la presente tesis fueron analizados estadísticamente utilizando el programa GraphPad Prism 5. Las diferencias significativas fueron evaluadas, según se indica en cada caso, con las siguientes pruebas: prueba de t de dos colas, prueba de ANOVA de una vía con prueba a posteriori de Bonferroni o Tukey y prueba de Barlett para evaluar homogeneidad de varianzas. Las variables que no siguieron distribuciones normales fueron analizadas con el test de Mann Whitney para comparaciones entre dos grupos y con el test de Kruskal-Wallis seguido del post-hoc test de comparación múltiple de Dunn para comparaciones de tres grupos experimentales. Todos los tests estadísticos tuvieron un intervalo de confianza del 95%.

5. Resultados

Para caracterizar el desarrollo de las CGs nacidas en el hipocampo adulto y de mediana edad se utilizó un retrovirus que expresa GFP para marcar los progenitores neurales de ratones de los grupos 2M: jóvenes, 5M: adultos y 8M: mediana edad y se estudió la morfología de su progenie a distintos tiempos post-inyección (Figura 9).

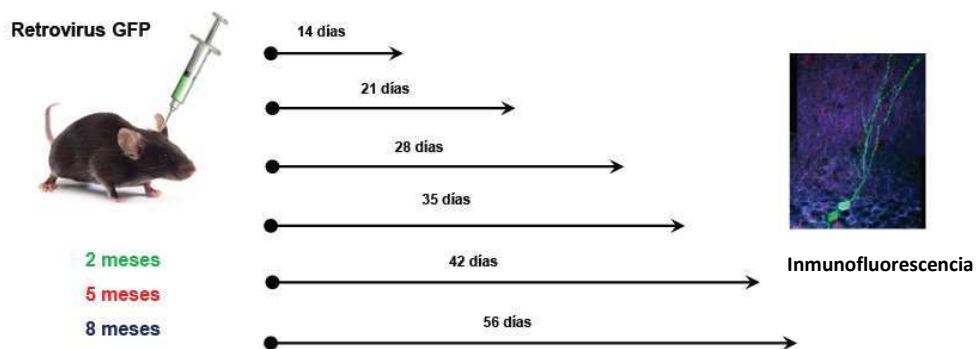


Figura 9. Protocolo experimental. Protocolo utilizado para estudiar la secuencia de desarrollo de las CGs nuevas en ratones envejecidos.

Al observar con baja magnificación la morfología de las CGs se torna evidente que a medida que el ratón envejece la tasa de neurogénesis decae y, a una misma edad intermedia (3 semanas), las CGs poseen características más inmaduras (Figura 10).

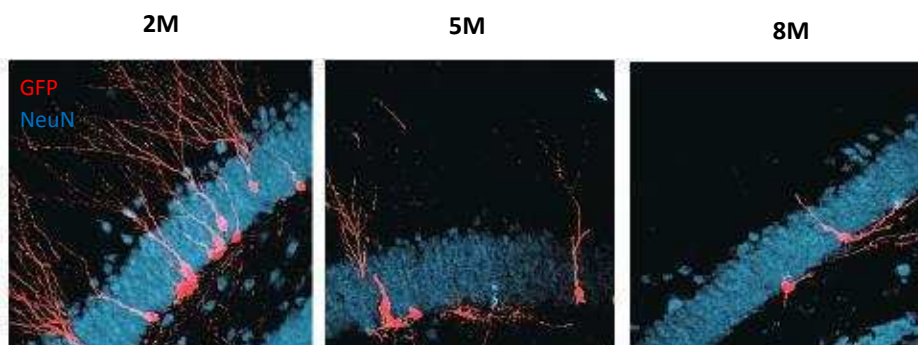


Figura 10. Ejemplo de neuronas GFP⁺ de 21 dpi de secciones coronales de la región septal del hipocampo nacidas en ratones de 2M (panel izquierdo), ratones de 5M (panel central) y 8M (panel derecho), (Escala: 20 μ m).

5.1. Efecto del envejecimiento en el árbol dendrítico de las CGs

Las neuronas de 14 días post inyección (dpi) nacidas en un ratón joven (2M) poseen un árbol dendrítico con una longitud total de $148 \pm 18 \mu\text{m}$ y más de 2 ramificaciones (Figura 11).

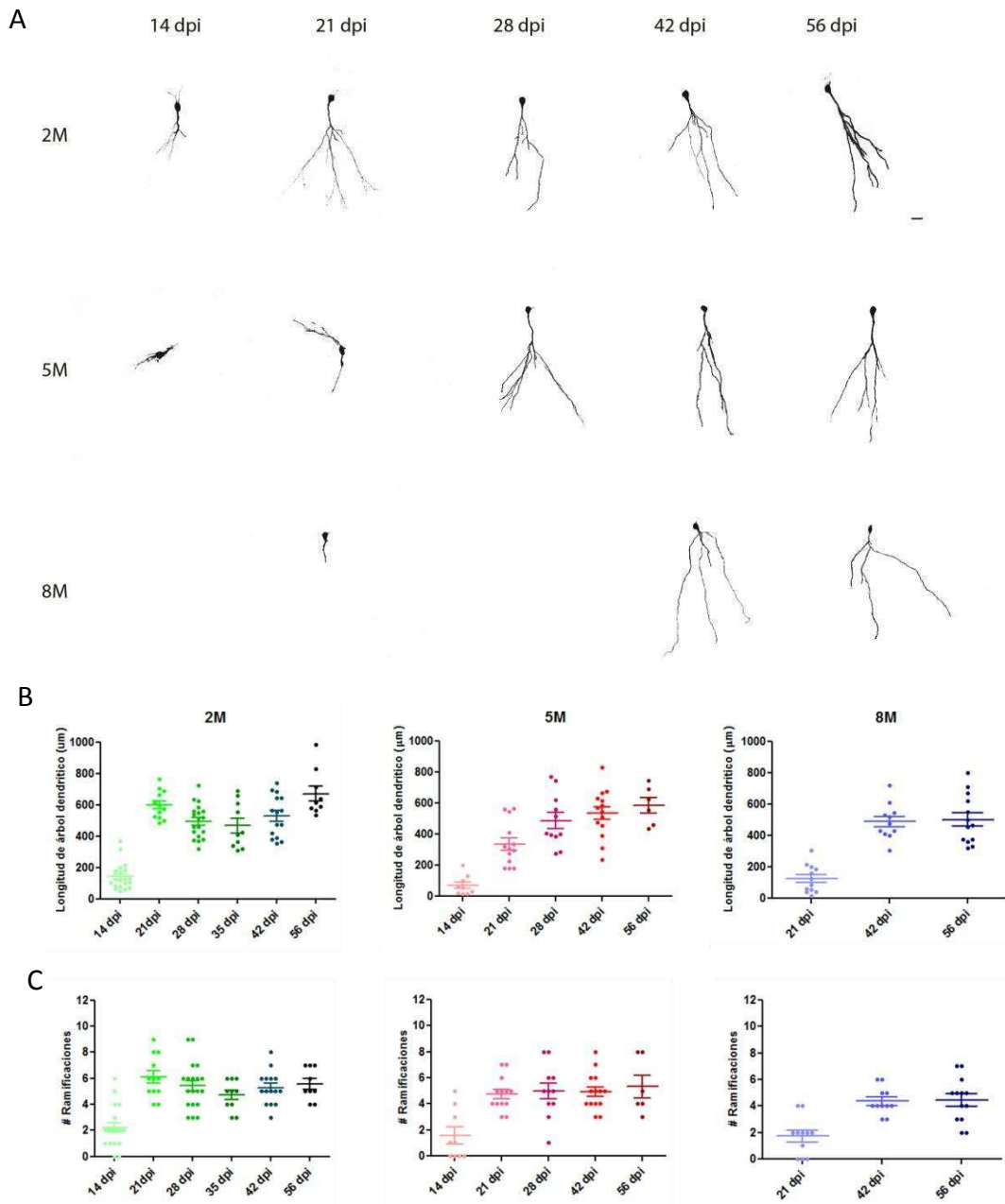


Figura 11. Longitud del árbol dendrítico de neuronas nacidas en ratones 2M, 5M y 8M. A. Ejemplos de neuronas de distintos dpi nacidas en ratones jóvenes, adultos y de mediana edad (Escala $20 \mu\text{m}$). **B.** Longitud del árbol dendrítico de las neuronas nacidas a distintas edades en ratones de 2M (panel izquierdo), 5M (panel central) y 8M (panel derecho). **C.** Número de ramificaciones de las neuronas nacidas a distintas edades en ratones de 2M (panel izquierdo), 5M (panel central) y 8M (panel derecho). En **B** y **C** se grafica la dispersión de los puntos (cada punto corresponde a una neurona analizada) y el promedio \pm SEM de no menos de 3 y hasta 6 ratones para cada punto.

Las dendritas de estas neuronas se encuentran perpendiculares a la capa granular, creciendo hasta la capa molecular donde reciben contactos excitatorios de los axones que descienden desde la corteza entorrinal.

Las neuronas de la misma edad nacidas en un animal adulto (5M) poseen $71 \pm 20 \mu\text{m}$ de árbol dendrítico, menos de la mitad de las nacidas en ratones jóvenes, y poseen sólo una ramificación promedio por cada neurona. En numerosos casos los procesos de estas neuronas se encuentran paralelos a la capa granular lo cual es indicativo de un estadio inmaduro así como también lo es la forma irregular de sus somas. Estas dendritas apenas alcanzan la capa molecular y por lo tanto no llegan aún a recibir conexiones corticales. Esto implica un retraso en la maduración de las neuronas nacidas en el hipocampo adulto comparado con el joven. Las neuronas de 21 dpi nacidas en un hipocampo de ratones de 8M poseen características similares a las de 14 dpi nacidas en un animal de 5M, con $124 \pm 25 \mu\text{m}$ de longitud de árbol dendrítico y características inmaduras así como también una sola ramificación en promedio. Debido a esta escasa longitud y ubicación de las dendritas es probable que estas CGs apenas reciban algún tipo de conexión GABAérgica, típica de los estadios más tempranos del desarrollo.

A partir de los 28 dpi las neuronas nacidas en los ratones de 2M y 5M alcanzan una longitud final de aproximadamente $600 \mu\text{m}$ y 5 ramificaciones a partir de una única dendrita primaria, lo cual condice con un fenotipo neuronal maduro. Las neuronas nacidas en animales de 8M alcanzan una meseta un poco menor de $500 \mu\text{m}$ de longitud dendrítica.

Al observar las curvas de desarrollo dendrítico y ramificaciones para cada grupo experimental se puede ver que el crecimiento del árbol dendrítico en neuronas nacidas en animales de 2M posee un aumento significativo desde los 14 hasta los 21 dpi para luego llegar a un plateau de $600 \mu\text{m}$. Sin embargo el crecimiento en los ratones de 5M es más lento a pesar de alcanzar el mismo valor final de longitud de árbol dendrítico. En cambio en los ratones de 8M a los 21 dpi la neurona posee un árbol dendrítico muy poco desarrollado y luego llega a una meseta un tanto menor, de aproximadamente $500 \mu\text{m}$ de longitud. Esta reducción en la longitud dendrítica total sugiere que el desarrollo neuronal en animales envejecidos no solo es más lento, sino que el fenotipo neuronal maduro podría alcanzar un menor grado de conectividad aferente (a menos que la densidad de espinas llegase a compensar este fenómeno ya que el número total de sinapsis se aproximaría como el producto de la densidad de espinas por la longitud total).

A la edad de 21 días es donde se observa una mayor diferencia en las longitudes del árbol dendrítico de las CGs nacidas en ratones jóvenes, adultos y de mediana edad (Figura 12A y B).

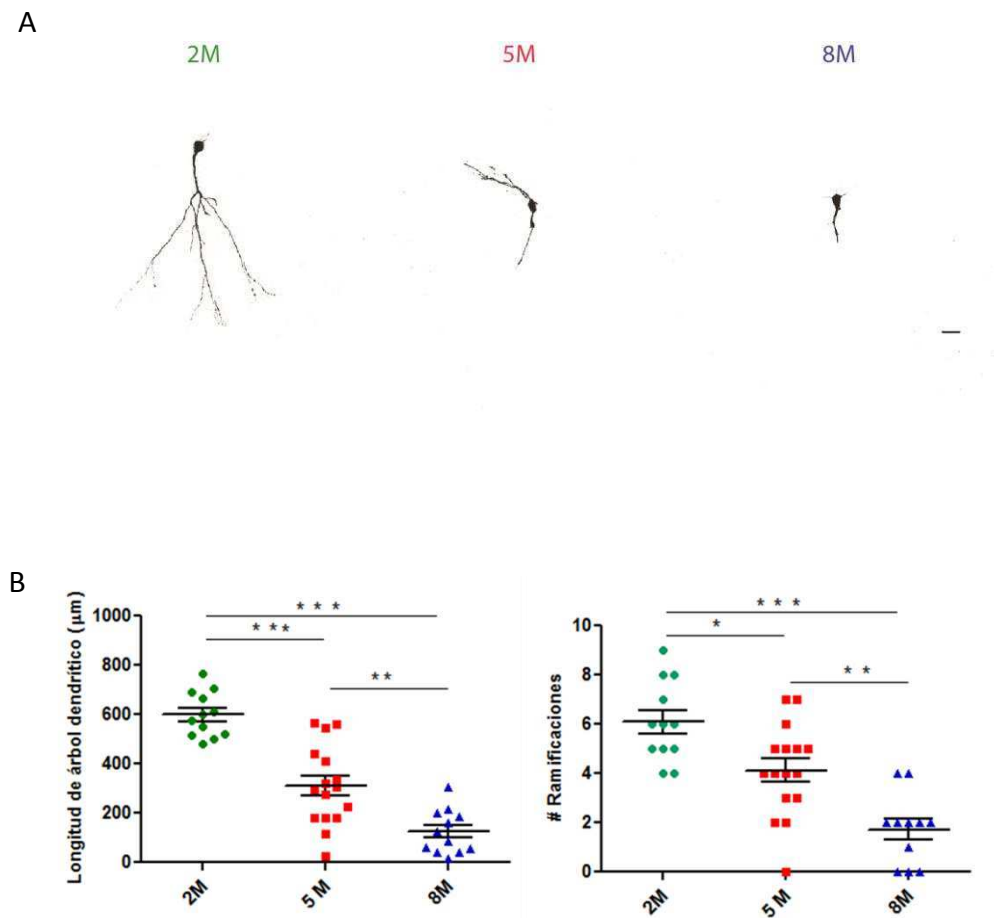


Figura 12. Árbol dendrítico de neuronas de 21 dpi. A. Ejemplos de neuronas de 21 dpi nacidas en ratones de 2M (panel izquierdo), 5M (panel central) y 8M (panel derecho) (Escala 20 μm). B. Longitud del árbol dendrítico (panel izquierdo) y del número de ramificaciones (panel derecho) de neuronas de 21 dpi nacidas en animales de 2, 5 y 8M. Se grafica la dispersión de los puntos (cada punto corresponde a una neurona analizada) y el promedio \pm SEM de un N=4 para cada grupo experimental. Se realizó ANOVA de una vía con post test de Tukey (***) p<0.001, (**) p<0.01, (*) p<0.05.

Las neuronas de 21 dpi nacidas en animales de 2M poseen un árbol dendrítico de 600 μm (longitud equivalente a la de una neurona madura) y 6 ramificaciones en promedio mientras que neuronas de la misma edad nacidas en animales de 5M poseen la mitad de longitud del árbol dendrítico de una neurona nacida en un animal joven y 4 ramificaciones en promedio. Más aun, una neurona de 21 dpi nacida en un animal de 8M posee tan solo aproximadamente 100 μm de longitud de árbol dendrítico y 1 ramificación en promedio lo cual condice con un fenotipo neuronal sumamente inmaduro. Este análisis confirma que el envejecimiento tiene un efecto

retardador en el crecimiento del árbol dendrítico que se detecta en estadios tempranos del desarrollo.

A partir de estos resultados se pueden construir curvas comparativas en donde se puede analizar el crecimiento del árbol dendrítico para distintas edades. Se puede observar que con el envejecimiento se produce un corrimiento de las curvas hacia la derecha (Figura 13).

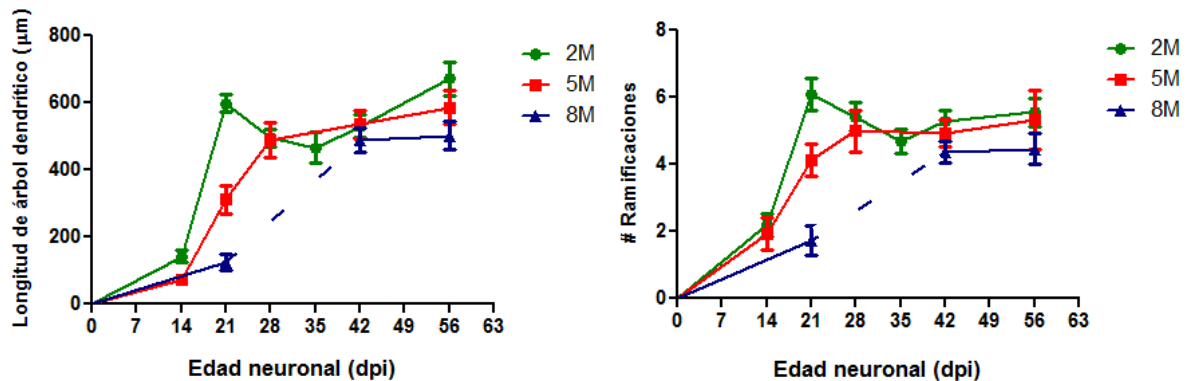


Figura 13. Curvas comparativas de la longitud del árbol dendrítico (panel izquierdo) y del número de ramificaciones (panel derecho) para animales de distintas edades. Para cada punto se grafica el promedio \pm SEM de no menos de 3 y hasta 6 ratones.

Estos resultados muestran que el envejecimiento ejerce un efecto sobre la tasa de desarrollo neuronal, que puede visualizarse tanto en la longitud del árbol dendrítico como en el número de ramificaciones.

5.2 Efectos del envejecimiento en la densidad de espinas dendríticas de las CGs

Las espinas dendríticas representan el correlato morfológico de la sinapsis glutamatérgica. La densidad de espinas no sólo es un indicativo del grado de madurez de una neurona sino también de su grado de conectividad con la red (Zhao and Gage 2006). Se realizó entonces una curva temporal para medir la densidad de espinas dendríticas en fragmentos localizados en el tercio medio de la capa molecular del giro dentado donde impactan axones de la vía perforante medial.

Al analizar la sinaptogénesis sobre CGs se observó que en ratones jóvenes hay un pico de densidad de espinas de aproximadamente 3.5 ± 0.1 espinas/ μm a 28 dpi que luego decae hacia un plateau de aproximadamente 2.5 espinas/ μm (Figura 14). Es notable que a los 28 dpi las sinapsis excitatorias aferentes de las CGs atraviesan un pico de plasticidad dependiente de actividad (Ge Neuron 2008).

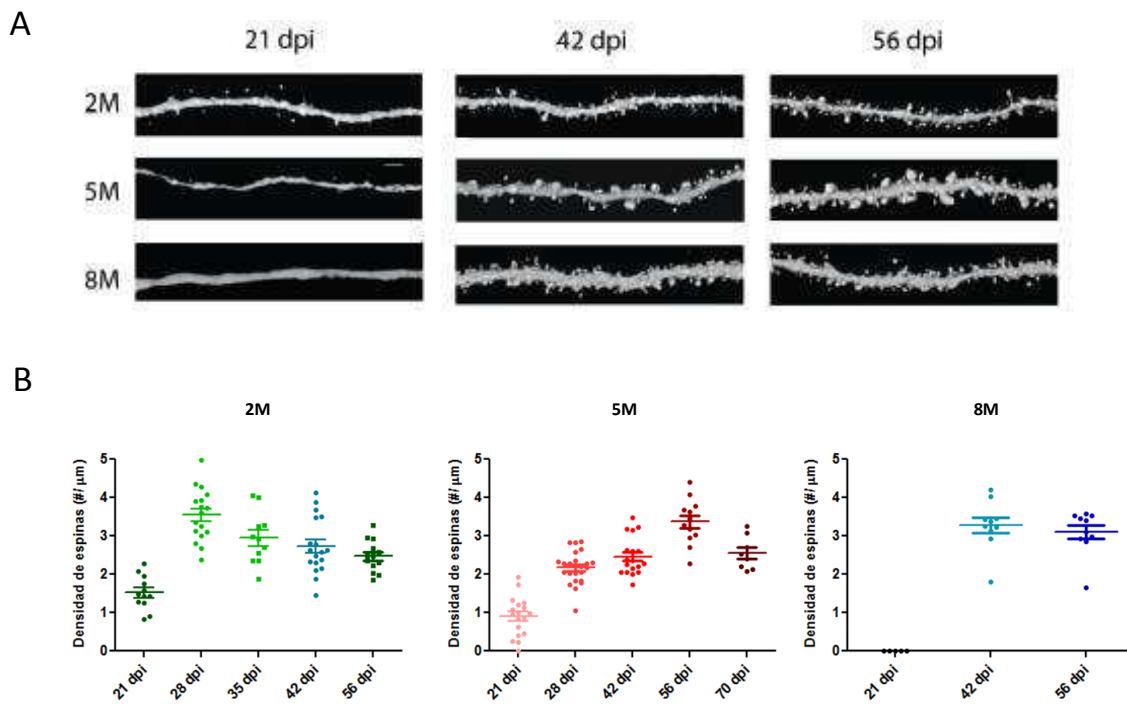


Figura 14. Densidad de espinas dendríticas de CGs nacidas en ratones de 2, 5 y 8M. **A.** Fragmentos de dendritas mostrando espinas dendríticas de neuronas de distintas edades nacidas en ratones de 2, 5 y 8M (Escala: $2 \mu\text{m}$). **B.** Densidad de espinas dendríticas de neuronas nacidas en ratones de 2, 5 y 8M (Panel inferior derecho, medio e izquierdo respectivamente). Se grafica la dispersión de los puntos (cada punto corresponde a una neurona analizada) y el promedio \pm SEM de no menos de 3 y hasta 6 ratones para cada intervalo.

En este contexto la posterior disminución en el número de sinapsis podría indicar un proceso de remodelado de la conectividad (pruning) en el cual inicialmente se genera una gran cantidad de contactos sinápticos a partir de los cuales son seleccionados sólo algunos, que van a permanecer en forma estable. Esta selección se haría por plasticidad de tipo hebbiana, donde las sinapsis cuya actividad presináptica se correlaciona con activación postsináptica serían reforzadas y aquellas cuya actividad no contribuye a la activación postsináptica serían eventualmente eliminadas (Dan and Poo 2006).

A diferencia de lo que sucede en ratones jóvenes, en los de 5M este pico de sinaptogénesis ocurre en forma más tardía, a los 56 dpi y luego decae a los 70 dpi. Esto sugeriría también una

demora en el período crítico de plasticidad dependiente de actividad mencionado anteriormente. En los ratones de 8M si bien a los 21 dpi no hay conexión con la aferencia glutamatérgica ya a los 42 dpi poseen una densidad de espinas comparable con la de una neurona con fenotipo maduro.

A los 21 dpi la densidad de espinas en ratones jóvenes es 1.5 ± 0.1 espinas/ μm y a los 5M es 0.9 ± 0.1 espina/ μm . Es notable que en los de 8M las CGs nuevas no poseen espinas dendríticas, sugiriendo la completa ausencia de conexión glutamatérgica aferentes (Figura 15).

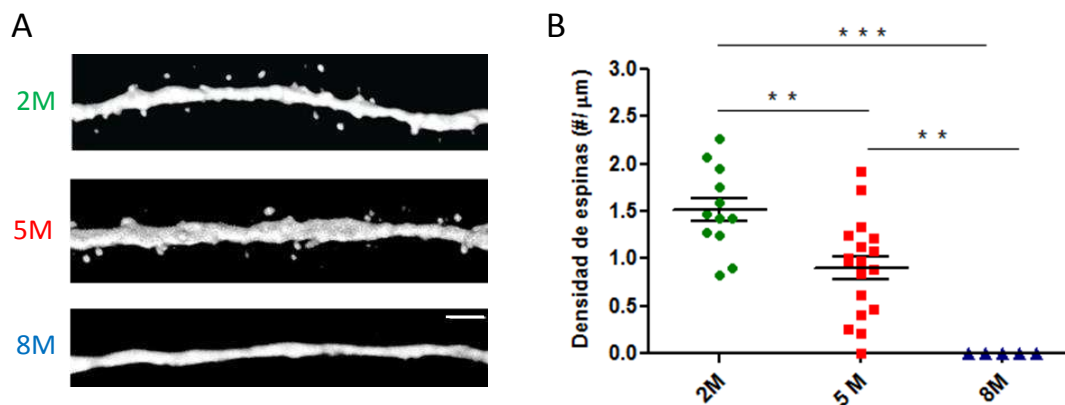


Figura 15. Densidad de espinas dendríticas de 21 dpi. **A.** Ejemplos de fragmentos dendríticos de neuronas de 21 dpi nacidas en ratones de 2M (panel superior), 5M (panel central) y 8M (panel inferior) (Escala = $2 \mu\text{m}$). **B.** Densidad de espinas dendríticas de neuronas de 21 dpi nacidas en animales de 2, 5 y 8M. Se grafica la dispersión de los puntos (cada punto corresponde a una neurona analizada) y el promedio \pm SEM de un $N=4$ para cada grupo experimental. Se realizó ANOVA de una vía con post test de Tukey (***) $p < 0.001$, (**) $p < 0.01$.

En curvas comparativas de la densidad de espinas dendríticas se observó conjuntamente el efecto que posee el envejecimiento en la sinaptogénesis (Figura 16).

Así como sucede con las curvas de longitud de árbol dendrítico, las curvas de densidad de espinas correspondientes a los ratones de 5M y 8M presentan un corrimiento hacia la derecha lo cual implica un retraso en la sinaptogénesis glutamatérgica (como se observa en las curvas de longitud de árbol dendrítico). La mayor diferencia de longitud de árbol dendrítico entre grupos experimentales ocurre a 21 dpi, las neuronas de esta misma edad nacidas en animales de distintas edades presentan también la mayor diferencia de número de espinas por μm . Esto es indicativo de que el efecto del envejecimiento en la maduración neuronal impacta mayormente en las 3 primeras semanas de desarrollo de la neurona. Tomando en cuenta los parámetros morfológicos

medidos (longitud de árbol dendrítico, ramificaciones y densidad de espinas) se puede concluir entonces que la edad produce un importante retraso de la maduración de las CGs nuevas.

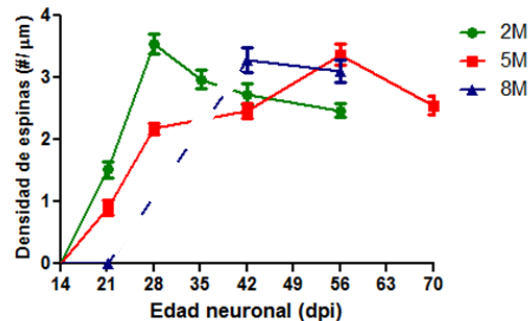


Figura 16. Curvas comparativas de la densidad de espinas dendríticas para ratones de 2, 5 y 8M. Para cada punto se grafica el promedio \pm SEM de no menos de 3 y hasta 6 ratones para cada punto analizado.

Sin embargo a pesar de que las neuronas de ratones de 8M sólo llegan a una longitud de árbol dendrítico final de 500 μ m las CGs nacidas en animales envejecidos logran alcanzar un fenotipo maduro.

5.3 Conectividad de las CGs nacidas en animales envejecidos

Dado el notable retraso en el desarrollo neuronal de las CGs nacidas en el hipocampo envejecido, surge como interrogante si estas neuronas llegan a conectarse a la red hipocampal preexistente. Para responder a esta pregunta se realizaron experimentos electrofisiológicos mediante la técnica de loose-patch, que permite registrar potenciales de acción sin alterar la composición intracelular. Para esto se marcaron neuronas nuevas con GFP según lo previamente descrito, en ratones de 5M y luego de 6 semanas (momento en el cual estas neuronas presentan un fenotipo maduro), se obtuvieron rebanadas agudas de hipocampo. Se estimuló la mPP que impacta en el tercio medio de las dendritas de las CGs. El estímulo fue calibrado antes de cada experimento según lo explicado en los métodos para evocar potenciales de acción en la capa granular. Se estimuló repetidamente a baja frecuencia con distintas intensidades y se obtuvieron los registros correspondientes (Figura 17). A pesar del retraso observado en el desarrollo neuronal de las CGs nacidas en animales de 5M, estas neuronas se han incorporado a los circuitos preexistentes ya que son capaces de disparar potenciales de acción evocados.

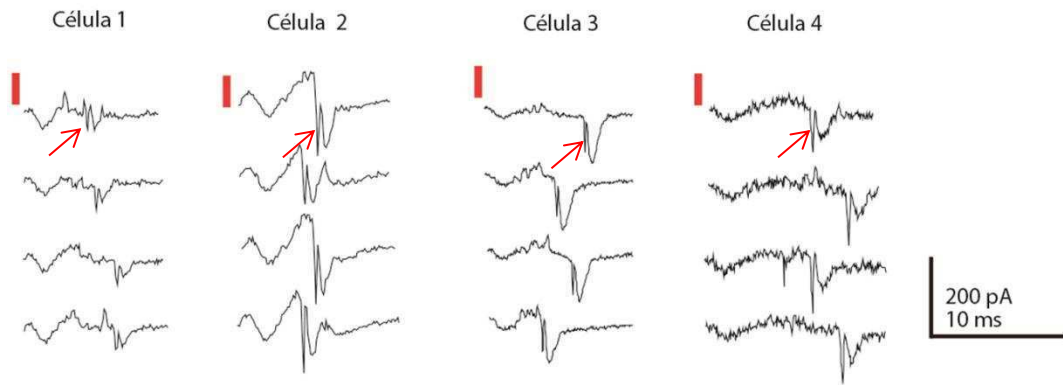


Figura 17. Trazos obtenidos para 4 células GFP⁺ de 42 dpi de ratones de 5M mediante la técnica de loose-patch. Las barras rojas indican el momento de estimulación y las flechas indican los potenciales de acción. Los trazos fueron obtenidos para intensidades de entre 20 y 40 μ A. (Experimentos realizados en colaboración con la Dra. M. Belén Pardi)

Esto permite concluir que estas neuronas logran adquirir una adecuada funcionalidad al alcanzar un fenotipo maduro.

5.4 Análisis de la actividad eléctrica de la capa granular del giro dentado de ratones envejecidos

La actividad eléctrica cumple un rol crucial en la maduración neuronal. Se estudió el estado de actividad eléctrica basal del giro dentado de ratones envejecidos para investigar una posible correlación entre los niveles de maduración de las neuronas nacidas en animales de 2M, 5M y 8M y la actividad local del circuito. Se utilizó como sensor de actividad neuronal la proteína ARC (activity related cytoskeleton associated protein) que forma parte de los genes de expresión inmediata inducido por actividad neuronal (Korb and Finkbeiner 2011). Se midió la expresión de ARC en las CGs del giro dentado de 2, 5 y 8M y se pudo observar una marcada disminución en la densidad de neuronas activas como consecuencia del envejecimiento (Figura 18). Este dato es coherente con la vasta bibliografía que correlaciona niveles de actividad eléctrica local con niveles de maduración neuronal (Overstreet 2006, Piatti 2011). También provee información sobre el estado de actividad en la cual se están desarrollando las neuronas nuevas en animales envejecidos. Bajos niveles de actividad eléctrica correlacionan con una velocidad de maduración más lenta.

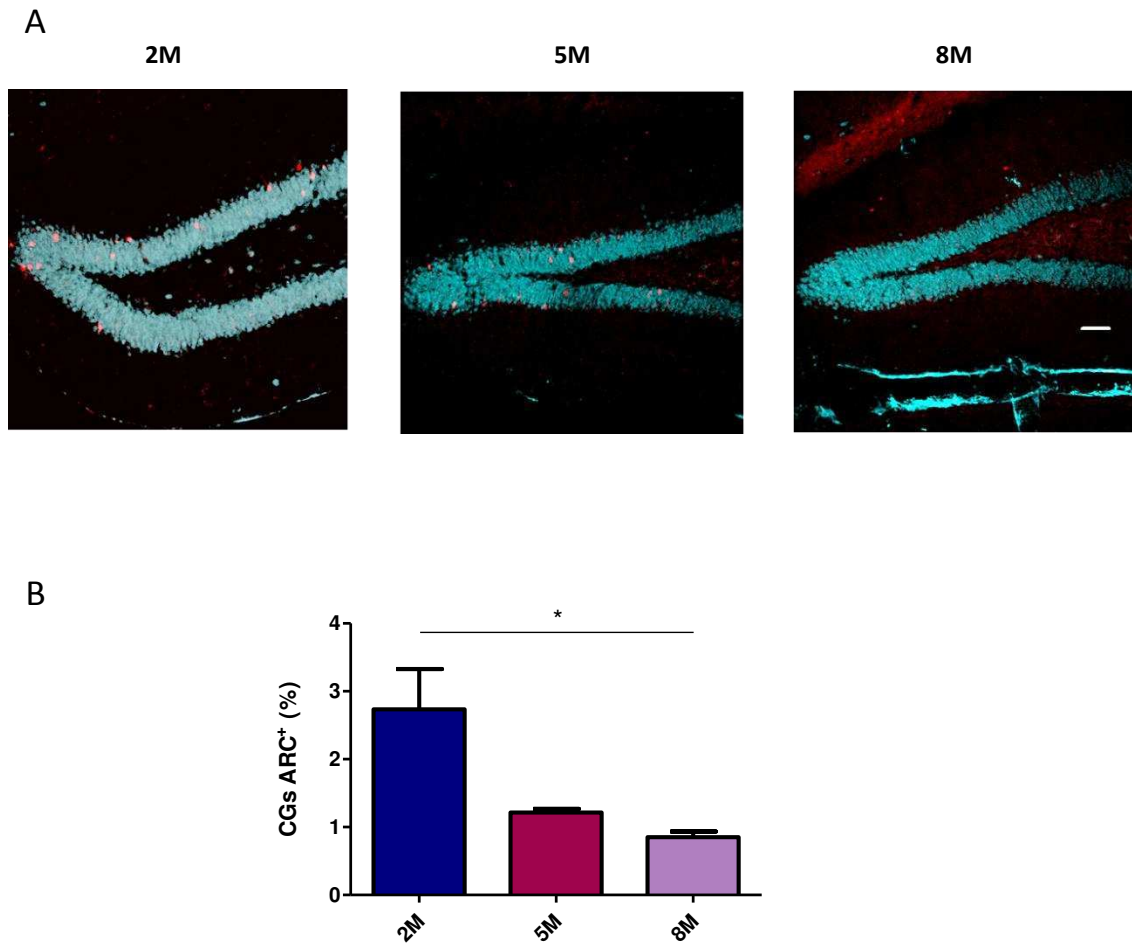


Figura 18. Actividad eléctrica de la capa granular del giro dentado de ratones de 2M, 5M y 8M. **A.** Imágenes del giro dentado mostrando niveles de expresión de ARC en neuronas granulares (NeuN⁺) en animales de 2M (panel izquierdo), 5M (panel central) y 8M (panel derecho) (Escala = 50 μ m). **B.** Cuantificación de la expresión de ARC. Las barras representan los datos promedio \pm SEM para N = 5 ratones de 2M y N = 3 ratones de 5M y 8M. Se realizó el test de Kruskal-Wallis seguido del test de múltiples comparaciones de Dunn (*) $p < 0.05$.

6. Conclusiones y Discusión

En esta primera parte de la tesis se realizó un análisis exhaustivo del desarrollo neuronal de las CGs del giro dentado en animales envejecidos. Previo a este trabajo se sabía que la tasa de neurogénesis disminuye significativamente con la edad en roedores (Kempermann et al., 1998; Kuhn et al., 1996; McDonald and Wojtowicz, 2005; Morgenstern et al., 2008; Rao et al., 2005) pero se desconocía si esto además trae aparejado alteraciones en el desarrollo neuronal.

Del esquema de la Figura 7 resulta evidente que si bien en esta tesis se discute sobre envejecimiento, no se emplearon animales de más de 8M (considerados de edad mediana). En primer lugar la utilización del retrovirus que expresa GFP no permite la visualización de una gran cantidad de neuronas nuevas en ratones de mayor edad (Morgenstern et al., 2008) en comparación con otras técnicas, por ejemplo la marcación con BrdU. Esta limitación tornaría

difícil el estudio de la neurogénesis en ratones más viejos. Por otra parte es notorio que a pesar de estudiar el desarrollo de las neuronas nuevas en el giro dentado de ratones de 5M (considerados adultos), ya se observan diferencias significativas en la tasa de maduración en comparación a un ratón de 2M. Esta tesis reporta diferencias significativas en el desarrollo neuronal de CGs nacidas en animales de entre 2 y 5 meses. Esta información es relevante ya que la neurogénesis adulta suele estudiarse en este rango de edades. La edad elegida del sujeto experimental tendrá un impacto directo en los resultados analizados.

Trabajos previos de nuestro y otros laboratorios ya habían descrito morfológica y funcionalmente el desarrollo de las CGs nacidas en el ratón adulto-joven (Espósito et al., 2005; Ge et al., 2006b; van Praag et al., 2002a; Zhao et al., 2006). Las neuronas maduras reciben información de la corteza entorrinal, la procesan, e impactan en CA3 para continuar con el circuito de información de la red local (Ramón y Cajal, 1893; Andersen et al., 1975; Amaral et al., 1995). A su vez, durante este proceso las CGs nuevas presentan características que las hacen distintas de aquellas nacidas en el desarrollo. A los 28 dpi poseen propiedades únicas: las mismas son reclutadas por estímulos más débiles (Dieni et al., 2013; Marin-Burgin et al., 2012) y presentan un mayor grado de plasticidad sináptica dependiente de actividad (Ge et al., 2007). Además estas neuronas se conectan con células piramidales de la región CA3 (Song et al., 2012; Temprana et al., 2015). Estas características analizadas en conjunto podrían implicar que las neuronas de 28 dpi serían preferentemente activadas *in vivo*. Esto le daría propiedades únicas de procesamiento de la información al giro dentado. Estas neuronas que todavía no han finalizado su desarrollo funcional por completo, ya poseen una morfología madura (árboles dendríticos desarrollados y dendritas cubiertas de contactos sinápticos glutamatérgicos). Es llamativo que aunque el fenotipo de las neuronas de 28 dpi de ratones de 2M sea maduro, su desarrollo funcional sea incompleto. De hecho las CGs de esta edad no se encuentran conectadas con uno de sus principales *targets* del hilus: las interneuronas PV⁺ (interneuronas positivas para parvalbúmina). Esta conexión puede ser visualizada recién a las 8 semanas (Temprana et al., 2015). Podría plantearse entonces la hipótesis de que es necesario un desarrollo morfológico completo para finalizar el desarrollo funcional.

Sería de sumo interés estudiar la progresión del desarrollo funcional de las CGs nacidas en animales envejecidos (propiedades electrofisiológicas intrínsecas, conexiones con el *input* y el *output*) para investigar si este aspecto del desarrollo neuronal también se encuentra retrasado con respecto al observado en ratones jóvenes.

En neuronas jóvenes las sinapsis glutamatérgicas presentan mucha motilidad, expansiones y retracciones (Fischer et al., 1998; McKinney et al., 1999; Ziv and Smith, 1996). El crecimiento o acortamiento de las espinas está directamente relacionado con un aumento o disminución en la fuerza sináptica (Zhou and Poo, 2004), y el crecimiento de nuevas espinas dendríticas está asociado a la formación de nuevas sinapsis (Holtmaat et al., 2006, 2005; Zito et al., 2009; Ziv and Smith, 1996). A pesar de lo antes descrito, los movimientos espontáneos de las espinas se encuentran reducidos en neuronas maduras (Dunaevsky et al., 1999).

En esta tesis se analizó minuciosamente la sinaptogénesis a distintos tiempos obteniendo como resultado la cinética de formación de espinas durante el desarrollo neuronal. El análisis de la densidad de espinas dendríticas reveló un pico de sinaptogénesis a las 4 semanas en los ratones de 2M (Figura 14B). Este pico coincide con el periodo de mayor excitabilidad y plasticidad de las CGs nuevas, y aporta un dato novedoso y coherente con la idea de que durante este periodo se produce un refinamiento de las conexiones. La densidad de espinas disminuye hasta alcanzar el nivel estable de 2.5 espinas/ μm . Se sabe también que durante un aprendizaje exitoso se remodelan de sinapsis glutamatérgicas. Tanto la exposición a un ambiente enriquecido como a un paradigma de aprendizaje motor aumentan la formación de contactos sinápticos en la corteza somatosensorial y la corteza motora respectivamente en ratones tanto jóvenes (de 1M) como adultos (de 5M) (Yan G. et al., 2009). De hecho, cambios en la estabilidad y fuerza de la conexión sináptica ocurren rápidamente a pocas horas del entrenamiento. Además de los cambios sinápticos descritos en paradigmas de aprendizaje, en esta tesis se describe un fenómeno de remodelado sináptico inherente al desarrollo de las CGs.

El pico de sinaptogénesis descubierto en neuronas de 28 dpi nacidas en ratones jóvenes también se observa a los 56 dpi en GCs nuevas de animales de 5M, lo cual sugiere que el período crítico de plasticidad ocurriría más tarde durante el envejecimiento. Este pico no es tan agudo lo cual podría indicar una velocidad ralentizada en los procesos de sinaptogénesis y remodelado.

Por otro lado las CGs de 21 dpi nacidas en un animal de 8M poseen un árbol dendrítico muy rudimentario y carecen de contactos sinápticos, lo cual significa que estas células se encuentran desconectadas del circuito local. A los 42 y 56 dpi el árbol dendrítico de estas neuronas llega a una longitud un tanto menor que aquellas nacidas en animales más jóvenes. Sin embargo la elevada densidad de espinas en estas edades sugiere una potencial conexión funcional

al circuito. De hecho la densidad de espinas en estos dos puntos es marcadamente elevada (alrededor de 3 espinas/ μm), un 20% mayor a la observada en GCs maduras de animales de 5M.

Es de sumo interés completar la curva de densidad de espinas para el grupo de 8M dado que parecería suceder que el pico de sinaptogénesis se encuentra ensanchado, es decir, hay una elevada densidad de espinas/ μm durante más tiempo. Saber cuánto dura este período y si hay un posterior remodelado sináptico daría una idea más acabada de la cinética de la sinaptogénesis de estas neuronas.

Una elevada cantidad de contactos sinápticos prolongada en el tiempo, sugeriría distintas posibilidades:

1) Podría representar un mecanismo que compensa la baja tasa de neurogénesis en ratones de mediana edad. Mantener un elevado número de contactos sinápticos disponibles para ser modelados durante más tiempo podría contrarrestar la falta de neuronas nuevas.

2) Por otra parte, dado que el árbol dendrítico de una neurona madura en ratones de 8M es más corto que en animales más jóvenes, una mayor densidad de contactos sinápticos podría compensar esta diferencia. Sin embargo, es posible que el último punto analizado para este grupo (56 dpi) pueda no representar el final de la maduración. Sería interesante repetir el análisis en etapas más avanzadas (por ejemplo, 70 dpi) para estudiar si finalizada la maduración de estas neuronas los parámetros morfológicos de las neuronas nacidas en ratones de 8M poseen características similares a las de CGs maduras nacidas en animales de 2M y 5M.

3) También podría ocurrir que en un hipocampo envejecido exista menor competencia por aumentar la fuerza de las sinapsis existentes y que el fenómeno de *pruning* no ocurra debido a la existencia de una menor plasticidad dependiente de actividad. Esta hipótesis sería consistente con la baja actividad medida en la capa granular del giro dentado en ratones de 8M (Figura 18).

Es posible que en ratones de edad avanzada las CGs sean incapaces de formar numerosos contactos sinápticos y el efecto del envejecimiento sea distinto dependiendo de la edad.

Existe una gran cantidad de trabajos sobre neurogénesis y envejecimiento, pero el fenómeno más estudiado fue la tasa de producción neuronal más que su desarrollo. Sin embargo, en un trabajo se analizó la colocalización de BrdU con el marcador neuronal NeuN en ratones de distintas edades y se observó un retraso en la expresión de NeuN en ratones envejecidos en las

primeras etapas de la maduración (Rao et al., 2005). Esto se condice con los hallazgos presentados en esta tesis.

El desarrollo del *input* de una CG nacida en un hipocampo joven se completa a la cuarta semana en donde presenta aferencia GABAérgica y glutamatérgica dendrítica y aferencia GABAérgica perisomática que es el último contacto que reciben las CGs. Luego de esto son capaces de disparar potenciales de acción maduros (Espósito et al., 2005). Se mostró en este trabajo que las neuronas de 42 dpi nacidas en un animal de 5M también son capaces de conectarse al circuito y ante un determinado estímulo, disparar potenciales de acción.

Por otro lado, el análisis de la densidad de CGs ARC⁺ en la capa granular del giro dentado sugiere que la actividad promueve la maduración neuronal. Ma y colaboradores observaron que la actividad neuronal regula la proliferación y supervivencia de células nuevas nacidas en el bulbo olfatorio y el giro dentado (Ma et al., 2009). Además en ambientes menos activos como la región temporal del hipocampo, la maduración es más lenta que la de las neuronas nacidas en un nicho más activo como lo es la región septal (Piatti et al., 2011). Estos datos son coherentes con los presentados en este trabajo. La actividad local del giro dentado disminuye con la edad, (Figura 18) y la velocidad de maduración se ralentiza.

Capítulo II: Modulación de la tasa de maduración de neuronas nacidas en el hipocampo envejecido

1. Introducción

El desarrollo de las CGs en distintos momentos de la vida del ratón ocurre a distintas velocidades. Durante el periodo postnatal la tasa de maduración de las neuronas nuevas es más rápida que en el animal joven (Espósito et al., 2005; Overstreet-Wadiche et al., 2006a; Zhao et al., 2006), y como se demostró en la primera parte de esta tesis, el desarrollo de estas células es aún más lento a medida que el ratón envejece. La tasa de maduración es modulada, entre otros factores, por la actividad del circuito local. De hecho, las neuronas nacidas en el neonato presentan una mayor activación de factores de transcripción dependientes de actividad así como potenciales gigantes despolarizantes que no se encuentran en el giro dentado adulto (Ben Ari, 2002). Además como se expuso en la primera parte de la tesis, una ralentización de la maduración neuronal en animales envejecidos correlaciona con una disminución de los niveles de actividad local medidos por el marcador de actividad neuronal ARC. Las CGs nacidas en animales jóvenes aceleran su maduración si se desarrollan en un ambiente hiperactivo generado por pilocarpina (un convulsivante) (Overstreet-Wadiche et al., 2006b). Además, cuando un ratón realiza ejercicio voluntario, se acelera la maduración de las CGs del polo temporal del hipocampo en donde el ejercicio físico aumenta la actividad eléctrica del circuito local (Piatti et al., 2011). Sin embargo la actividad basal del circuito no es la única que influye en la maduración neuronal. La propia actividad de la célula también es un factor importante para su maduración. De hecho, cuando la actividad neuronal es disminuida sobre-expresando el canal de potasio Kir 2.1, su maduración se ve ralentizada y estas neuronas sobreviven un 40 % menos que las neuronas control (Piatti et al., 2011). Más aún, resultados recientes de Diego Álvarez y Damiana Giacomini obtenidos en nuestro laboratorio indican que la activación de las neuronas nuevas mediante Receptores Activables Solamente por Ligandos Sintéticos (RASSLs; (Alexander et al., 2009; Armbruster et al., 2007)) también acelera la maduración de las neuronas nuevas en el polo temporal del hipocampo. Esto demuestra que la actividad eléctrica propia de la célula es crucial para el desarrollo de la neurona, su integración al circuito y su supervivencia. El modo en el que las neuronas perciben la actividad y a su vez responden aumentando o disminuyendo su propia actividad permanece siendo objeto de

estudio. Precusores neuronales en estadio proliferativo reciben inputs sinápticos GABAérgicos de interneuronas que expresan parvalbúmina (interneuronas PV⁺). De esta forma estas interneuronas jugarían un rol de intermediarias entre la actividad del circuito local y la regulación de la proliferación de los precusores neuronales (Song et al., 2013).

El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) regula la supervivencia y diferenciación neuronal (Chan et al., 2008), el crecimiento dendrítico, y la sinaptogénesis (Greenberg et al., 2009; Horch et al., 1999; Ji et al., 2010; Jin et al., 2003). La delección del receptor de BDNF, TrkB, altera la dendritogénesis y la sinaptogénesis de las neuronas nuevas del hipocampo (Bergami et al., 2008; Reichardt, 2006). Neuronas nacidas en ratones en los cuales se ha eliminado el BDNF en el hipocampo presentan árboles dendríticos cortos y no expresan marcadores de madurez (Chan and Cordeira 2008). Las CGs nuevas son incapaces de diferenciarse y de madurar en ratones *Bdnf* (*klox/klox*) en los que la región 3' UTR del ARNm del BDNF se encuentra truncado. Más interesante aún es que estas alteraciones en la neurogénesis también se observaron en ratones en los que TrkB está selectivamente eliminado de las interneuronas PV⁺ (Waterhouse et al., 2012). Esto significa que el BDNF, su receptor y las interneuronas PV⁺ juegan un rol crucial en la diferenciación y desarrollo neuronal.

La síntesis y secreción de BDNF es dependiente de la actividad neuronal (Chen et al., 2003; Kuczewski et al., 2008; Matsuda et al., 2009; Schinder et al., 2000). El ARNm del BDNF aumenta con tan solo unos días de ejercicio físico en el hipocampo murino (Neeper et al., 1996) y correr aumenta además los niveles de ARNm de c-Fos (Soya et al., 2007), y la densidad de ARC en la capa granular del giro dentado (Piatti et al., 2011), (ambos marcadores de actividad neuronal). Ráfagas de oscilaciones theta producen liberación y un aumento de la señalización de BDNF en CA1 (Edelmann et al., 2015). Además el BDNF posee un rol importante en la plasticidad sináptica (Boulanger and Poo, 1999; Zhang and Poo, 2002). El BDNF aumenta los niveles del receptor de NMDA en la membrana de células del hipocampo y puede registrarse una importante entrada de Ca²⁺ a través de estos receptores adicionales (Caldeira et al., 2007). Existen trabajos que muestran que el efecto del BDNF en la plasticidad sináptica es tanto pre como postsináptico (Gärtner et al., 2006; Xu et al., 2000). Si se estimulan neuronas hipocampales en cultivo en forma presináptica, puede detectarse liberación postsináptica de BDNF (Hartmann et al., 2001). Estos datos sugieren una interrelación entre la actividad eléctrica del circuito, la actividad intrínseca de la célula y el BDNF como factor neurotrófico y mediador de la actividad celular.

De la parte 1 de la tesis se desprende que el envejecimiento enlentece el desarrollo neuronal, pero se desconoce si la tasa de maduración de estas células es modulable. En la segunda parte de la tesis se plantea el interrogante de si estas neuronas que se encuentran enlentecidas en su desarrollo conservan la capacidad de ser reguladas por distintos estímulos.

2. Hipótesis y objetivos

Para tratar de comprender los mecanismos subyacentes al desarrollo neuronal lento observado en animales envejecidos, resulta de suma utilidad modular la velocidad de maduración y analizar así qué parámetros son importantes, necesarios y/o suficientes. De lo expuesto en la introducción se desprende la siguiente hipótesis:

La disminución general en la actividad del hipocampo sería una causa importante para el desarrollo neuronal lento.

- El **primer objetivo** de esta segunda parte fue analizar el efecto de un aumento de la actividad del circuito local a través del ejercicio voluntario en el desarrollo de las CGs nacidas en animales envejecidos.
- El **segundo objetivo** consistió en analizar el efecto de la actividad intrínseca de CGs en animales envejecidos y determinar la relevancia de factores autónomos de célula.
- El **tercer y último objetivo** fue estudiar el rol del BDNF en el desarrollo e integración neuronal en ratones envejecidos.

3. Estrategia experimental

Para llevar a cabo el primer objetivo se marcaron CGs nacidas en animales de 5M y 8M con el retrovirus que expresa GFP y se expuso a los ratones a ejercicio voluntario. Luego del sacrificio se analizó la morfología neuronal de las células marcadas.

En cuanto al segundo objetivo (aumentar la actividad intrínseca de las CGs) se utilizó la tecnología de los RASSLs puesta a punto en el laboratorio por Georgina Davies-Sala, Damiana Giacomini y Diego Álvarez. El receptor hM3Dq (asociado a proteína G inhibitoria) es derivado del receptor muscarínico humano y está modificado con el fin de que se active solo por un ligando sintético, clozapine-N-oxide (CNO) y no por acetilcolina (el agonista endógeno). El CNO atraviesa la barrera hematoencefálica y puede ser administrado intraperitonealmente o por vía oral en el agua (Bender et al., 1994).

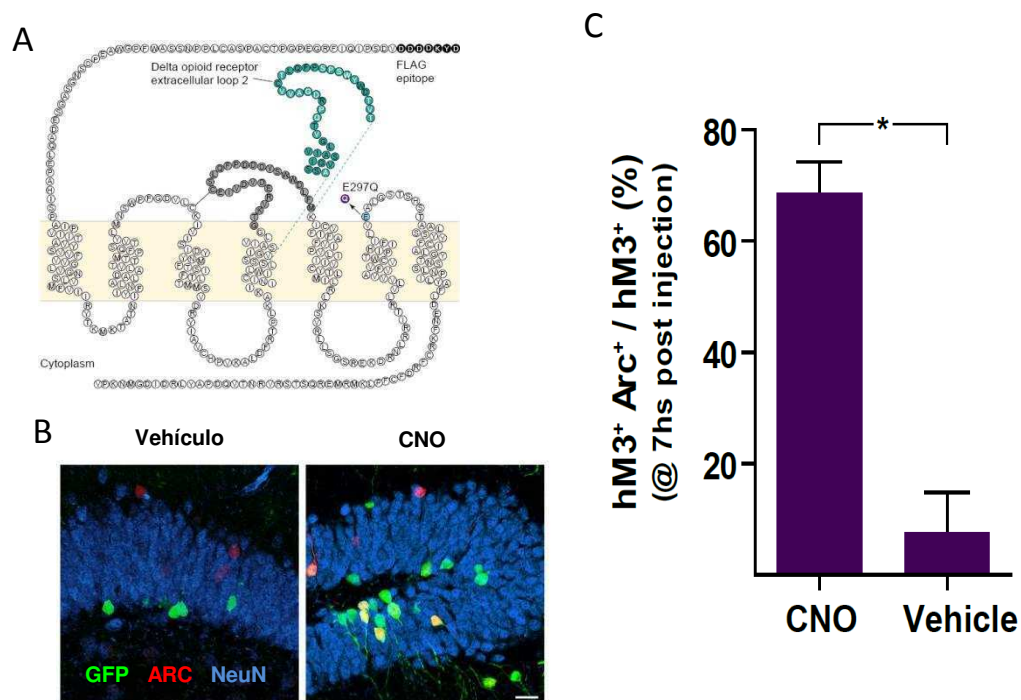


Figura 19. Activación *in vivo* de neuronas que expresan el RASSL hM3Dq. **A.** Esquema del receptor muscarínico hM3Dq mutado. **B.** Imagen confocal de secciones de hipocampo que contienen CGs que expresan hM3Dq de 28 dpi obtenidas 7 hs después de la inyección de vehículo (panel izquierdo) o CNO (panel derecho) (dosis = 5 µg/g, i.p.) (Escala = 20 µm). **C.** Cuantificación de la inducción de ARC por el CNO en neuronas que expresan hM3Dq-GFP (*) $p < 0,05$, con N=5 ratones para el grupo de vehículo y N=3 para el grupo de CNO, test de dos colas de Mann-Whitney. Se muestra el promedio \pm ESM (Datos de Damiana Giacomini y Diego Alvarez, Temprana et al, 2015).

El receptor hM3Dq está asociado a una proteína G inhibitoria la cual al activarse cierra canales del tipo GIRK, lo cual reduce la conductancia de potasio y por lo tanto despolariza la membrana. Se estudió la funcionalidad de los receptores hM3Dq *in vivo* luego de la administración intraperitoneal de CNO, para lo cual se analizó la expresión del gen de respuesta inmediata ARC en neuronas GFP⁺ expresando h3MD. De esta forma se comprobó que la administración de CNO activa las CGs que expresan hM3Dq (Figura 19).

Se inyectaron ratones de 5M con el retrovirus que codifica para hM3Dq y GFP en el giro dentado derecho. Los ratones bebieron CNO disuelto en el agua en una concentración de 20 µg/ml (se asumió un consumo de agua diario de 5 ml y un peso de los ratones de 20 g. Dosis= 5 µg/g). Además en el hemisferio izquierdo se inyectó un retrovirus que codifica sólo para RFP para controlar si el CNO altera por sí mismo el desarrollo de neuronas que no expresan el receptor sintético.

Por último, para estudiar el rol del BDNF en el desarrollo neuronal de CGs nacidas en ratones envejecidos, se utilizó un *shARN* dirigido a la proteína Lrig1, que forma parte de la familia de proteínas ricas en leucinas (LRRs) y ejerce un efecto de modulación negativo sobre la función del receptor TrkB (Gustavo Paratcha, comunicación personal) (Gur et al., 2004; Laederich et al., 2004; Ledda et al., 2008; Shattuck et al., 2007). De esta forma, se estudió el efecto de la disminución de un modulador negativo de la vía de señalización de BDNF en el desarrollo neuronal de CGs nacidas en animales de 5M.

4. Materiales y métodos

4.1. Producción de vectores virales

La producción de los retrovirus para los experimentos de ejercicio físico fue preparada de la misma forma que en la primera parte de la tesis por N. Beltramone.

Para producir el virus que expresa hM3Dq se utilizó un retrovirus no replicativo derivado del Moloney murine leukemia virus (MMLV) (Laplagne et al., 2006). El retrovirus se ensambló a través de 3 plásmidos conteniendo la cápside (CMV-vsrg), proteínas virales (CMV-gag/pol), y GFP fusionado al RASSL, hM3Dq. Para aumentar la expresión de la proteína GFP-hM3Dq se reemplazó la secuencia IRES con el péptido viral autocatalítico 2A. La producción del retrovirus se realizó de la misma forma que en la primera parte.

Se utilizó el pRetro-U6G shRNA para expresar el Lrig1-shRNA en las neuronas nuevas (Ledda et al., 2008). La construcción Lrig1-shRNA-GFP fue comprada en Cellogenetics, Inc. y gentilmente cedida por el grupo de Gustavo Paratcha. La producción del retrovirus se realizó de la misma forma que la explicada anteriormente.

4.2. Animales y cirugía estereotáxica

En esta segunda parte de la tesis se consideraron los mismos grupos experimentales que en la primera parte (2M, 5M y 8M). Se utilizaron ratones C57Bl6/J hembra en jaulas grupales de 3 a 6 animales habituados a nuestra sala de bioterio desde una semana previa a todos los experimentos. Tres días antes de la cirugía se colocaron ruedas en las jaulas para correr (una rueda cada dos individuos). Las ruedas permanecieron en las jaulas hasta el día siguiente de la operación. En los casos de los grupos experimentales de ejercicio voluntario (5MC y 8MC) la rueda se mantuvo hasta el día del sacrificio.

La cirugía se realizó de la misma forma que la descrita en el capítulo 1 de esta tesis

4.3. Perfusión e inmunofluorescencia

La perfusión fue realizada de la misma forma que en la primer parte de la tesis

En las inmunofluorescencias se utilizó la técnica de “free-floating” (rodajas libres en solución) utilizando secciones del polo septal del hipocampo. El protocolo es el mismo expuesto en la primera parte de la tesis.

Todos los anticuerpos fueron aplicados en la solución de bloqueo. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: NeuN, anticuerpo monoclonal de ratón (1:50, FH Gage); GFP, anticuerpo policlonal de pollo (1:500, Invitrogen); GFP, anticuerpo policlonal de conejo conjugado con Alexa 543 (1:500, Invitrogen), RFP anticuerpo policlonal de conejo (1:500, Rockland) Calbindin (Cb) anticuerpo de conejo (1:1000, Swant). Se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios (1:250, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA): ratón Cy5 (cyanine 5), conejo Cy3 y pollo Cy2 todos hechos en burro. Las soluciones utilizadas fueron las mismas que en la primera parte de materiales y métodos.

4.4. Microscopía confocal y análisis de imágenes

Al igual que en la primera parte de la tesis, se presentan los resultados obtenidos en el hipocampo septal, determinando los límites de su extensión con las coordenadas del Atlas del cerebro de ratón de Paxinos & Franklin como lo realizado en Piatti et al 2011.

Las imágenes de inmunofluorescencias triples (GFP, Cb y NeuN) se adquirieron con un microscopio confocal Zeiss Meta 710 (Zeiss, Jena, Alemania). En los análisis se incluyeron sólo las células GFP localizadas en la zona subgranular (10 μm) y en la capa granular. La colocalización con Cb se analizó a través de todo el eje Z de cada célula GFP⁺ en planos ópticos únicos de espesor 0.7 a 1 μm , con un aumento digital de 2 utilizando el objetivo de 40 X, apertura numérica (nA) 1.2 inmersión en aceite.

La morfología neuronal se analizó de la misma forma que la explicada en el Capítulo 1.

4.5. Western Blots

Hipocampos de ratones de 2, 5 y 8 meses fueron disectados y homogeneizados (10% p/v) en buffer frío 25 mM Tris-HCl a pH 7,4 conteniendo 0,32 M de sacarosa, 1 mM de EDTA e inhibidores de proteasas. La homogeneización fue realizada con 40 golpes en un homogeneizador de vidrio. Luego se centrifugó a 1000 g por 10 minutos (clarificación). Los homogenatos fueron analizados por Western Blot para cuantificar los niveles proteicos de BDNF (Paratcha et al., 2001). Las membranas fueron examinadas con el escáner de fluorescencia Storm 840 (Molecular Dynamics) y analizadas con el software ImageQuant (Molecular Dynamics). Los anticuerpos utilizados fueron: el anticuerpo Anti-BDNF (1:1000) de Santa Cruz y anti- β III Tubulina (1:5000) de Promega. Los western blots fueron realizados por la Dra. Paula Fontanet.

4.6. Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó de la misma forma que en el capítulo 1 de la tesis.

5. Resultados

5.1. Efectos del ejercicio físico en CGs nacidas en animales envejecidos.

Para estudiar cómo afecta el ejercicio físico al desarrollo neuronal se utilizó el retrovirus que expresa el reportero GFP. El mismo fue inyectado en el giro dentado de ratones de 5 y 8 meses de vida que corrieron durante 21 días hasta su sacrificio. Luego se midió la longitud del árbol dendrítico y la densidad de espinas dendríticas (Figura 20).



Figura 20. Protocolo experimental. Protocolo utilizado para estudiar el efecto del ejercicio físico en el desarrollo de las CGs nuevas en ratones envejecidos.

Tal como se mostró en el capítulo 1, las células nuevas desarrolladas en un ratón sedentario de 5M poseen una longitud dendrítica de tan solo $338 \pm 39 \mu\text{m}$ (Figura 21A). Sin embargo, cuando el ratón corre estas neuronas aceleran su maduración y su árbol dendrítico crece hasta un promedio de $594 \pm 57 \mu\text{m}$, un valor similar al de neuronas nacidas en ratones de 2M. Asimismo las ramificaciones aumentan en número en ratones de 5MC (Figura 21B). Estos resultados permiten concluir que un aumento de la actividad del circuito favorece un aumento en la longitud total del árbol dendrítico de las CGs nuevas. Un efecto similar se pudo observar al estudiar la densidad de espinas (Figura 22A).

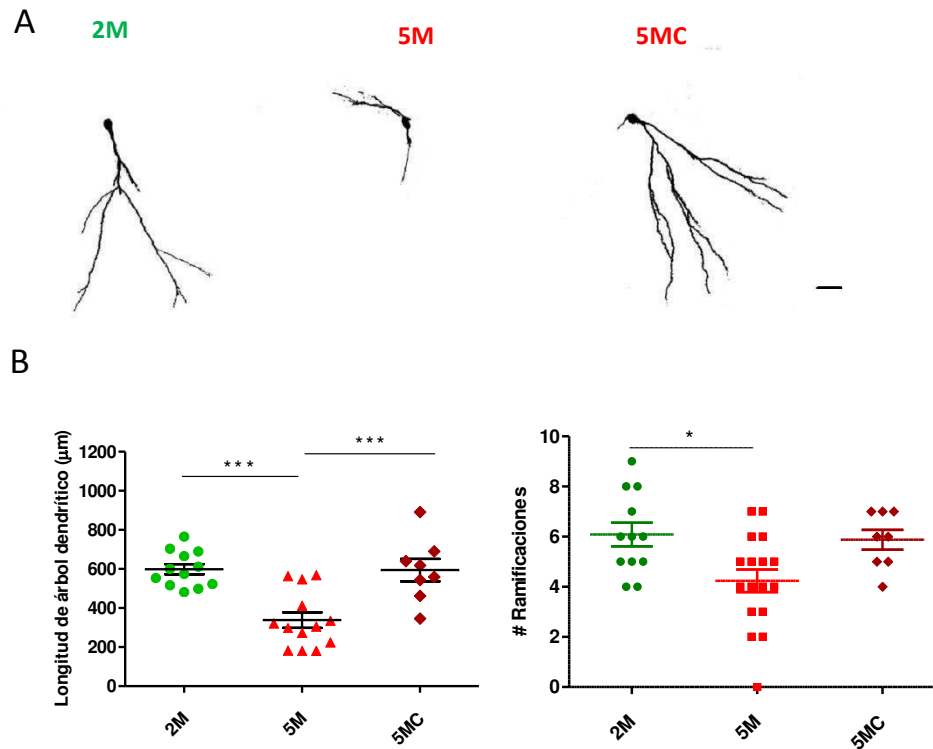


Figura 21. Árbol dendrítico de neuronas de 21 dpi nacidas en ratones de 2M, 5M y 5MC. A. Ejemplos de neuronas de 21 dpi nacidas en ratones de 2M (panel izquierdo), 5M (panel central) y 5MC (panel derecho) (Escala = 20 µm). B. Longitud del árbol dendrítico (panel izquierdo) y del número de ramificaciones (panel derecho) de neuronas de 21 dpi nacidas en animales de 2M, 5M y 5MC. Se grafica la dispersión de los puntos (cada punto corresponde a una neurona analizada) y el promedio \pm SEM de un N=4 para 2M y 5M y N=3 para 5MC. Se realizó ANOVA de una vía con post test de Tukey (***) $p < 0.001$ (*) $p < 0.05$.

Mientras que una neurona de 21 dpi en un ratón de 5M sedentario posee tan solo 0.7 ± 0.1 espinas/µm, en un ratón corredor la densidad de espinas de las neuronas de 21 dpi aumenta y se vuelve equivalente a la de los ratones jóvenes (1.5 ± 0.1 espinas/µm) (Figura 22B).

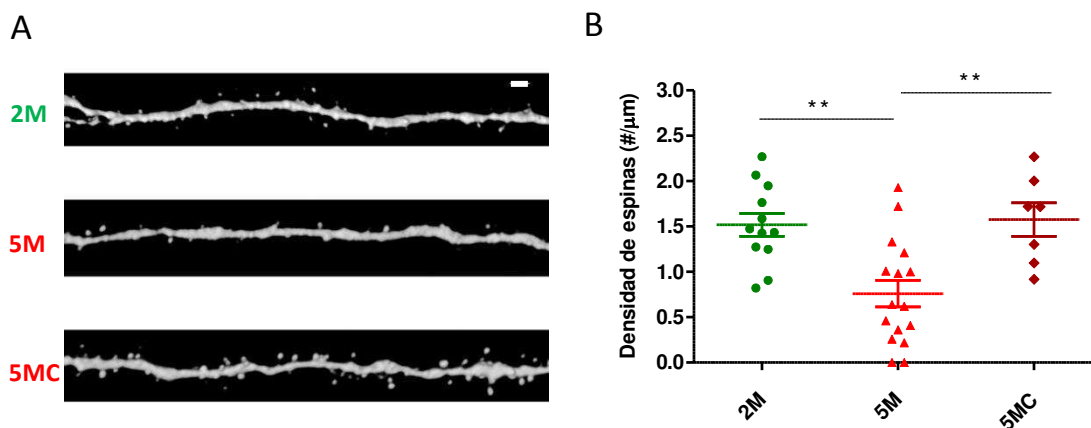


Figura 22. Densidad de espinas dendríticas de 21 dpi nacidas en ratones de 2M, 5M y 5MC. A. Ejemplos de fragmentos dendríticos de neuronas de 21 dpi nacidas en ratones de 2M (panel superior), 5M (panel central) y 5MC (panel inferior). (Escala = 2 µm) B. Densidad de espinas dendríticas de neuronas de 21 dpi nacidas en animales de 2M, 5M y 5MC. Se grafica la dispersión de los puntos (cada punto corresponde a una neurona analizada) y el promedio \pm SEM de un N=4 para cada grupo experimental. Se realizó ANOVA de una vía con post test de Tukey, (**) $p < 0.01$.

Esto significa que la conectividad sináptica aumenta cuando se somete al ratón a un estímulo fisiológico que aumenta la actividad local.

Los marcadores neuronales resultan de suma utilidad para de identificar fenotipos celulares y en particular evaluar estadios de madurez de las neuronas a lo largo de su desarrollo (Zhao et al 2008).

Calbindin (Cb) es un buffer de calcio citoplasmático que se empieza a expresar en las CGs nuevas del hipocampo adulto a partir de la tercera semana (Sloviter 1989; Brandt 2003). Se decidió entonces analizar la colocalización de GFP con Cb. De acuerdo con resultados previos del laboratorio (Piatti 2011) el porcentaje de colocalización en ratones jóvenes fue de $63 \pm 10 \%$, mientras que en ratones de 5 meses se redujo a $29 \pm 6 \%$. Cuando los ratones son expuestos a la rueda para correr este porcentaje se recupera hasta valores similares a los del ratón joven ($67 \pm 3 \%$) (Figura 23).

Los datos de longitud de árbol dendrítico, densidad de espinas y expresión de Cb en conjunto muestran que un aumento en la actividad del circuito local, en este caso generado por el ejercicio físico, acelera el desarrollo de las neuronas nacidas en animales de 5M. Esto significa que, aunque las CGs nacidas en un ratón sedentario presentan un atraso en su desarrollo, conservan elevados niveles de plasticidad que pueden “despertarse” por estímulos fisiológicos como el ejercicio físico.

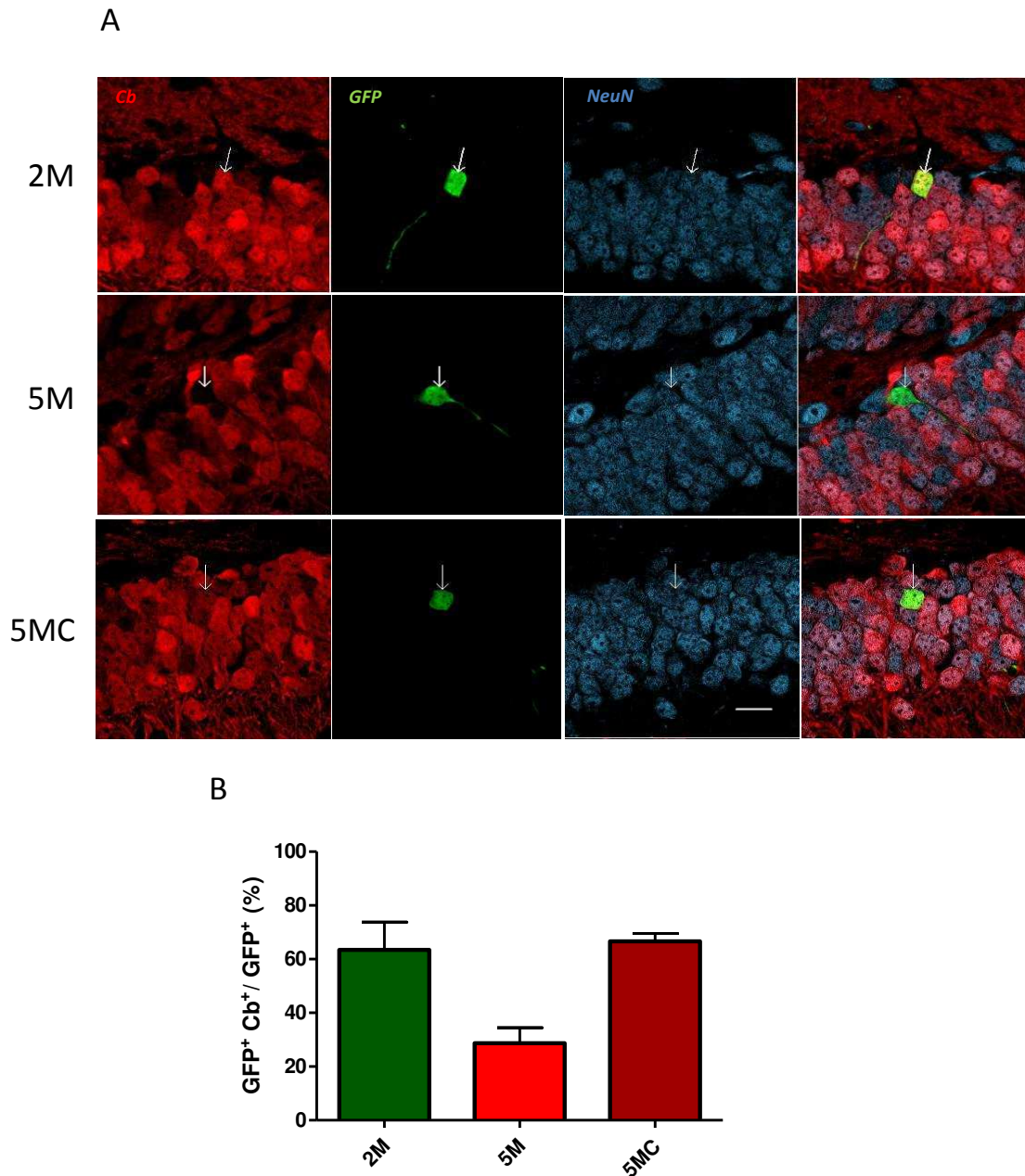


Figura 23. Análisis de la expresión de Cb en las neuronas de 21 dpi del giro dentado de ratones de 2M, 5M y 5MC. **A.** Ejemplo de una neurona GFP⁺ de un animal sedentario de 2M que expresa Cb (paneles superiores) 5M, que no expresa Cb (paneles medios) y una que expresa Cb de 5MC (paneles inferiores). Los paneles horizontales son planos ópticos únicos mostrando los 3 canales de fluorescencia por separado y su superposición en el cuarto panel hacia la derecha. (Escala = 20 μ m). **B.** Cuantificación de la expresión de Cb en neuronas nuevas de 21 dpi de 2M, 5M y 5MC. Las barras representan promedio \pm SEM, con N = 138, 3 ratones (2M); N = 59, 3 ratones (5M); N = 34, 2 ratones (5MC). Se realizó el test de Kruskal-Wallis y el test de múltiples comparaciones de Dunn.

Teniendo en cuenta estos resultados cabe preguntarse si las neuronas nacidas en ratones más viejos (8M) son modulables por el ejercicio físico o si, alternativamente, su marcado enlentecimiento madurativo disminuye la sensibilidad al estímulo de correr. El ejercicio físico

produce un aumento muy significativo en la longitud dendrítica de las CGs de 21 dpi, alcanzando valores similares a aquello observado en ratones de 2M (Figura 24A). En términos cuantitativos, en ratones de 8M el ejercicio aumenta la longitud dendrítica a los 21 dpi aproximadamente en un 500 % y además incrementa el número de ramificaciones al triple comparado con animales sedentarios (Figura 24B).

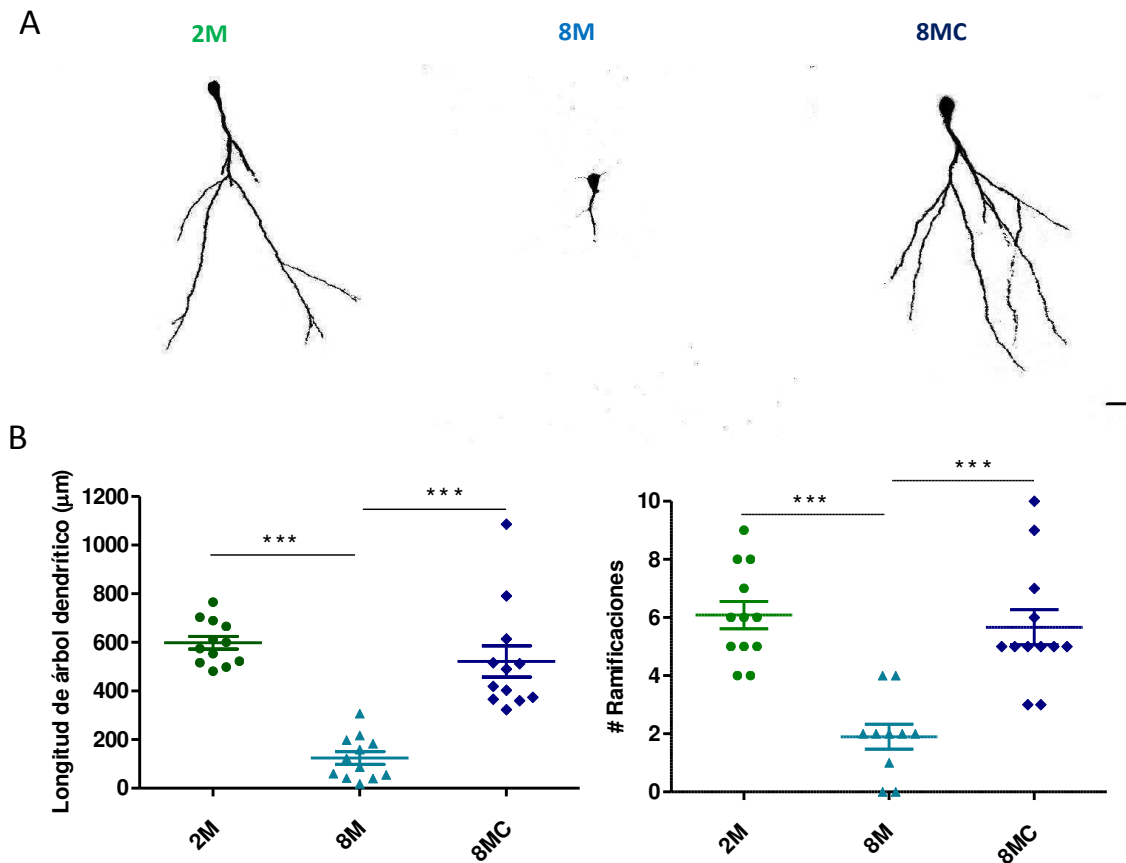


Figura 24. Árbol dendrítico de neuronas de 21 dpi nacidas en ratones de 2M, 8M y 8MC. A. Ejemplos de neuronas de 21 dpi nacidas en ratones de 2M (panel izquierdo), 8M (panel central) y 8MC (panel derecho) (Escala = 20 µm). B. Longitud del árbol dendrítico (panel izquierdo) y del número de ramificaciones (panel derecho) de neuronas de 21 dpi nacidas en animales de 2M, 8M y 8MC. Se grafica la dispersión de los puntos (cada punto corresponde a una neurona analizada) y el promedio ± SEM de un N=4 para 2M y 8M y N=3 para 8MC. Se realizó ANOVA de una vía con post test de Tukey (***) p<0.001.

Más sorprendente aún es el efecto observado a nivel de la conectividad glutamatérgica. Ya se describió que mientras las neuronas de 21 dpi nacidas en ratones de 2 meses poseen 1.5 ± 0.1 espinas/µm, neuronas de la misma edad nacidas en ratones de 8M no poseen espinas dendríticas, es decir, están desconectadas de la aferencia glutamatérgica. En estas condiciones el ejercicio físico indujo un incremento sorprendente de la sinaptogénesis, que no solo revirtió el efecto del

envejecimiento sino que además se alcanzó una densidad de espinas mayor a 2 espinas/ μm , aún superior a lo observado en ratones de 2M (Figura 25).

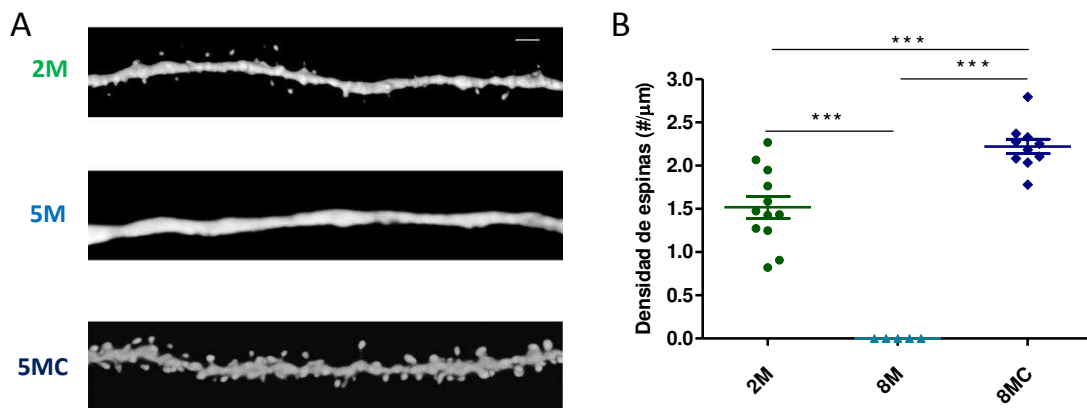


Figura 25. Densidad de espinas dendríticas de 21 dpi nacidas en ratones de 2M, 8M y 8MC. A. Ejemplos de fragmentos dendríticos de neuronas de 21 dpi nacidas en ratones de 2M (panel superior), 8M (panel central) y 8MC (panel inferior) (Escala = $2\mu\text{m}$). B. Densidad de espinas dendríticas de neuronas de 21 dpi nacidas en animales de 2M, 8M y 8MC. Se grafica la dispersión de los puntos (cada punto corresponde a una neurona analizada) y el promedio \pm SEM de un N=4 para cada grupo experimental. Se realizó ANOVA de una vía con post test de Tukey, (***) $p<0.001$.

Esto significa que estas neuronas, que en un ratón sedentario de 8 meses se encuentran literalmente desconectadas de los axones de la vía perforante, en ratones de 8MC no sólo superan los niveles de densidad de espinas de neuronas de 21 dpi nacidas en animales jóvenes sino que adquieren una cantidad de espinas equivalente a una CG madura. Este hallazgo también resalta la enorme plasticidad de estas CGs nacidas en ratones de mediana edad (Figura 25).

Paralelamente, el análisis de colocalización con Cb indicó que CGs de tres semanas en ratones sedentarios de 8 meses poseen una baja expresión de este marcador (20%), incrementada por ejercicio físico hasta >80%. Esta observación es también consistente con una fuerte aceleración en el desarrollo neuronal (Figura 26).

En conjunto estos resultados muestran que a pesar de tener un mayor retraso en el desarrollo, las neuronas de 21 dpi nacidas en ratones de 8 meses son más susceptibles de ser moduladas por el ejercicio físico.

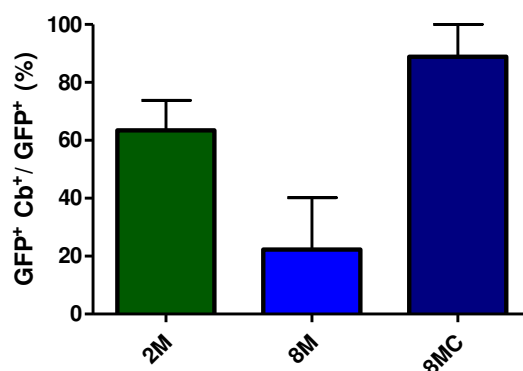


Figura 26. Cuantificación de la expresión de Cb en las neuronas de 21 dpi del giro dentado de ratones de 2M, 8M y 8MC. Expresión de Cb en neuronas nuevas de 21 dpi de 2M, 8M y 8MC. Cada barra es el porcentaje promedio \pm SEM para las condiciones indicadas (N = 138 de 3 animales del grupo de 2M, 29 de 4 ratones del grupo de 8M y 16 neuronas de 3 ratones de 8MC). Se realizó el ANOVA con test de Kruskal-Wallis y el test de múltiples comparaciones de Dunn.

Se expuso en la introducción que en roedores los niveles de BDNF en el hipocampo aumentan cuando el animal corre. Para determinar si existe una correlación entre la tasa de maduración neuronal y los niveles de expresión de BDNF, se analizaron los niveles de BDNF por medio de western blot en el hipocampo de ratones sedentarios y corredores. En primer lugar, se observó una correlación inversa entre la cantidad de BDNF y la edad del animal (Figura 27). Esto sugeriría que la disminución en la producción de BDNF podría determinar la reducción en la tasa de maduración observada en el envejecimiento.

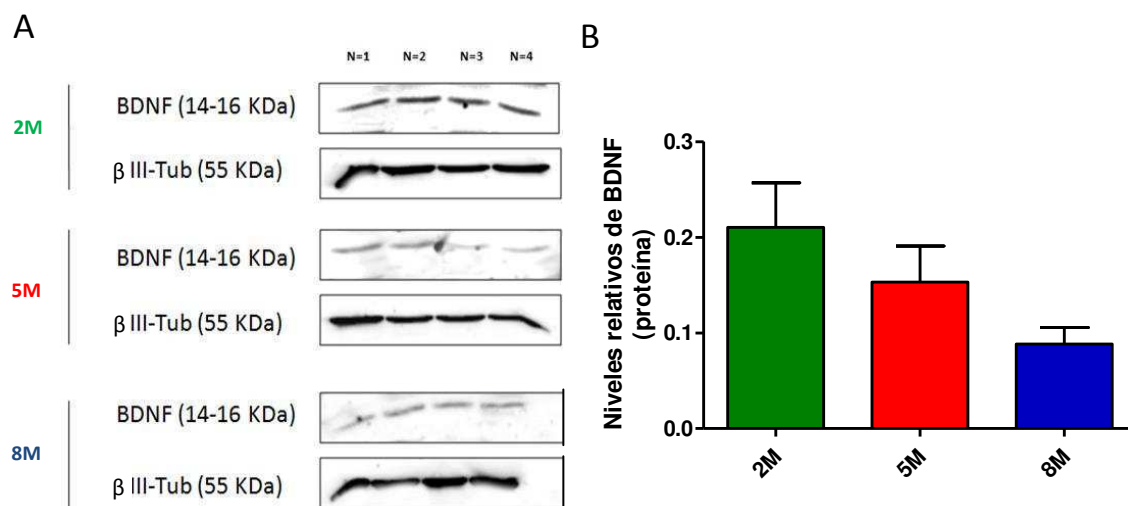


Figura 27. Cuantificación de niveles de BDNF en hipocampos de 2, 5 y 8 meses. **A.** Blots obtenidos en hipocampos de 2M (panel superior), 5M (panel medio) y 8M (panel inferior) para BDNF y β III tubulina. **B.** Cuantificación de los niveles proteicos de BDNF. Cada barra denota el nivel relativo de BDNF a β III tubulina \pm SEM. Se realizó el test de Kruskal-Wallis seguido del test de Dunn de múltiples comparaciones.

A continuación se analizó si los niveles de BDNF en hipocampo se modifican luego del ejercicio físico. Para ello se sometieron a ratones de 5M y 8M a la rueda y se sacrificaron 21 días

después. Los niveles de BDNF en hipocampo se compararon con ratones sedentarios. En coherencia con la bibliografía (Vivar 2012) se observó un aumento de este factor neurotrófico tanto en ratones de 5M como de 8M (Figura 28).

El aumento observado del BDNF en el hipocampo de los grupos 5MC y 8MC correlaciona con el aumento de la longitud del árbol dendrítico, de la densidad de espinas y del aumento de la expresión de Cb observado en estos animales. Esto sugiere que la aceleración en la maduración de neuronas nacidas en el giro dentado de ratones corredores podría estar mediada por este factor neurotrófico.

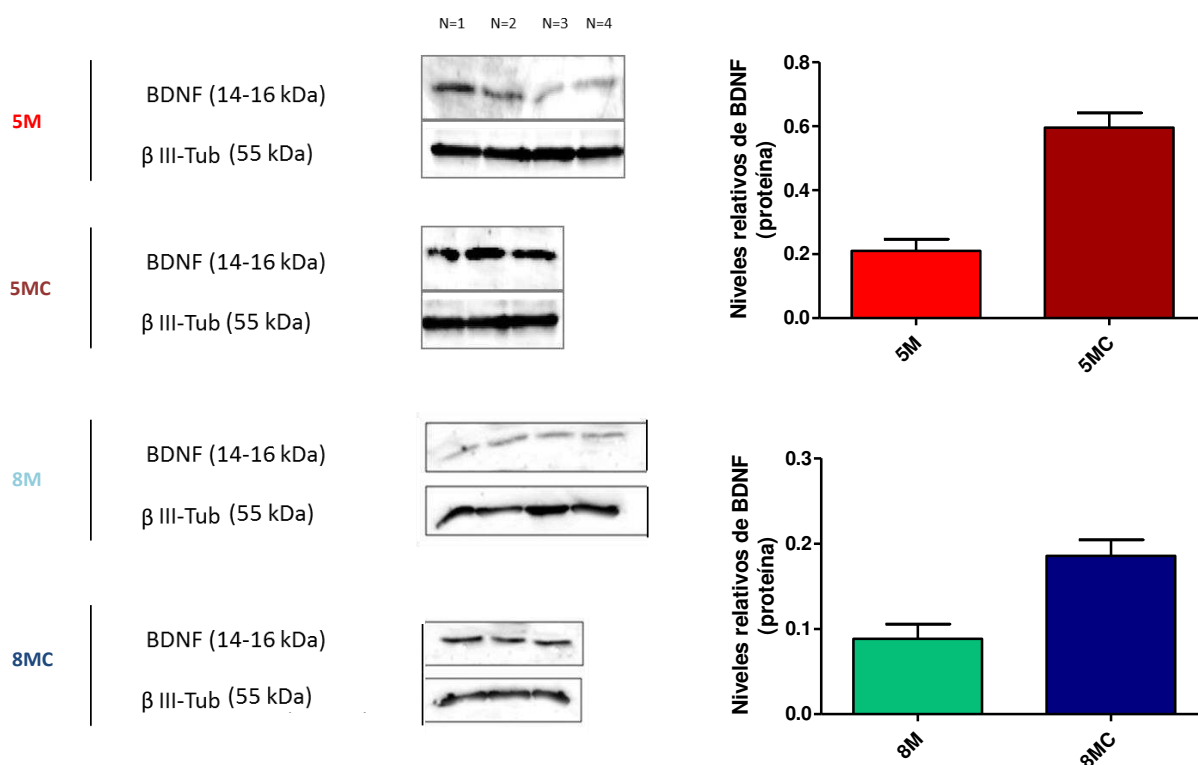


Figura 28. Cuantificación de niveles de BDNF en hipocampos de 5 y 8 meses de ratones sedentarios y que corren. A. Blots obtenidos en hipocampos de 5M y 5MC (paneles superiores), y 8M y 8MC (paneles inferiores) para BDNF y β III tubulina. **B.** Niveles proteicos de BDNF en ratones de 5M y 5MC (panel superior), y 8M y 8MC (panel inferior). Cada barra denota el nivel relativo de BDNF a β III tubulina \pm SEM. Se realizó el test de Mann Whitney.

Si bien los niveles proteicos de BDNF presentan un incremento mayor en ratones 5MC que el observado en los de 8MC, es notable el marcado efecto que tiene la actividad física en la morfología neuronal de este último grupo.

5.2. Efectos del aumento de la actividad intrínseca en las neuronas nacidas en animales envejecidos

La actividad intrínseca de las neuronas es importante para el correcto desarrollo neuronal. Esto se vuelve evidente cuando una disminución de la actividad intrínseca por la sobre-expresión del canal de potasio Kir 2.1 (Piatti et al., 2011) ralentiza la maduración neuronal y un aumento de la misma (por expresión del RASSL hM3Dq en las neuronas) la acelera. Teniendo en cuenta estos resultados se estudió si las neuronas de 21 dpi de ratones de 5M son modulables de forma autónoma de célula aumentando su actividad intrínseca. Para esto se inyectó un retrovirus que codifica para hM3Dq acoplado a la proteína reportera GFP en el hemisferio derecho y un retrovirus codificando para el reportero RFP en el hemisferio izquierdo para determinar si el CNO tendría efectos independientes de la expresión del receptor. Se esperaron 21 días durante los cuales se les administró CNO en el agua a beber (Figura 29).

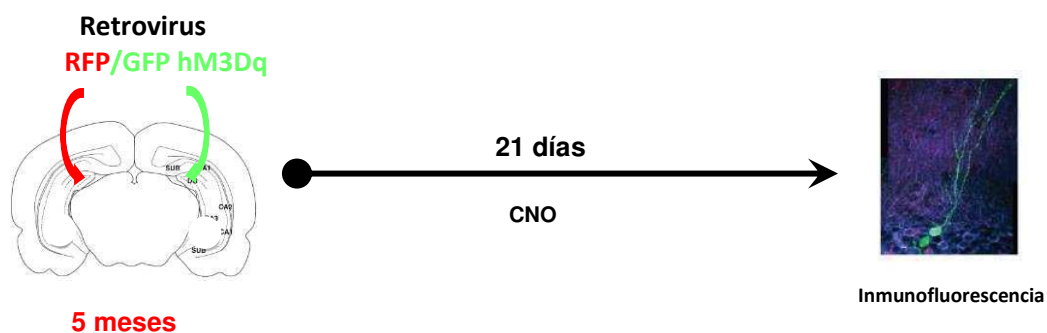


Figura 29. Protocolo experimental. Protocolo utilizado para estudiar el efecto del aumento de la actividad intrínseca en el desarrollo de las CGs nuevas en ratones envejecidos.

Al analizar la morfología neuronal de los dos grupos control (neuronas que expresan RFP expuestas a CNO y neuronas que expresan hM3Dq pero no recibieron CNO) se observó que sus árboles dendríticos miden $<300 \mu\text{m}$, muestran <4 ramificaciones y <1 espinas/ μm . Esto se condice con lo expuesto en el Capítulo 1 sobre el estado madurativo de neuronas de 21 dpi nacidas en ratones de 5M. El grupo experimental correspondiente a neuronas que expresan el RASSL hM3Dq y fueron expuestas al CNO presentan un árbol dendrítico de mayor longitud ($477 \pm 38 \mu\text{m}$).

Asimismo el número de ramificaciones aumenta significativamente de 4 a 7 (Figura 30). Estos dos datos implican un árbol dendrítico de mayor complejidad y longitud en aquellas neuronas cuya activación intrínseca fue aumentada en forma remota utilizando CNO.

En cuanto a las espinas dendríticas si bien no se observa una diferencia significativa entre los grupos control y el grupo experimental, se puede ver una leve tendencia hacia un mayor número de contactos en el grupo hM3Dq+CNO (Control RFP+CNO= 0.6 ± 0.2 ; hM3Dq+Agua= 1.1 ± 0.1 ; hM3Dq+CNO= 1.2 ± 0.2) (Figura 30).

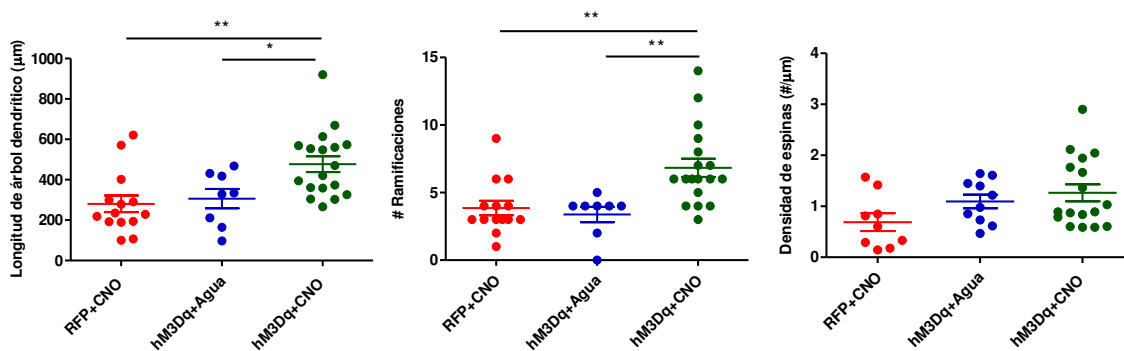


Figura 30. Cuantificación de parámetros morfológicos de neuronas activadas por RASSLs en ratones de 5M. Longitud del árbol dendrítico, número de ramificaciones y densidad de espinas dendríticas en grupos control (RFP+CNO y hM3Dq+Agua) y en el grupo experimental hM3Dq+CNO. Se grafica la dispersión de los puntos (cada punto corresponde a una neurona analizada) y el promedio \pm SEM de un N=4 para el grupo hM3Dq+CNO y N=3 para los dos grupos control. Se realizó ANOVA de una vía con post test de Tukey, (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$.

Estos resultados analizados en conjunto demuestran que el nicho en el que maduran las CGs nuevas no es el único determinante del desarrollo neuronal en ratones envejecidos ya que un aumento de la actividad intrínseca es suficiente para acelerar la tasa de maduración neuronal.

5.3. Efectos de la modulación de la vía de BDNF en las neuronas nacidas en animales envejecidos

Se investigó si la disminución de Lrig1 afecta el crecimiento dendrítico, efecto que estaría probablemente mediado por BDNF hipocampal.

Con el fin de manipular experimentalmente la disponibilidad de receptores de BDNF se inyectó un retrovirus que codifica para un shARN dirigido a Lrig1 acoplado a la proteína reportera

GFP. De esta forma se buscó disminuir los niveles de Lrig1 en forma autónoma de célula y aumentar así la cantidad de receptores TrkB disponibles. 21 días después se analizó el árbol dendrítico de las neuronas nuevas nacidas en animales de 5M (Figura 31).



Figura 31. Protocolo experimental. Protocolo utilizado para estudiar el efecto del BDNF en el desarrollo de las CGs nuevas en ratones envejecidos.

Resultados preliminares indicarían que una disminución Lrig1 produce un crecimiento significativo del árbol dendrítico en comparación a neuronas infectadas con GFP nacidas en animales de 5M (5M= $338 \pm 40 \mu\text{m}$; 5M *shLrig1*= $517 \pm 51 \mu\text{m}$ (Figura 32).

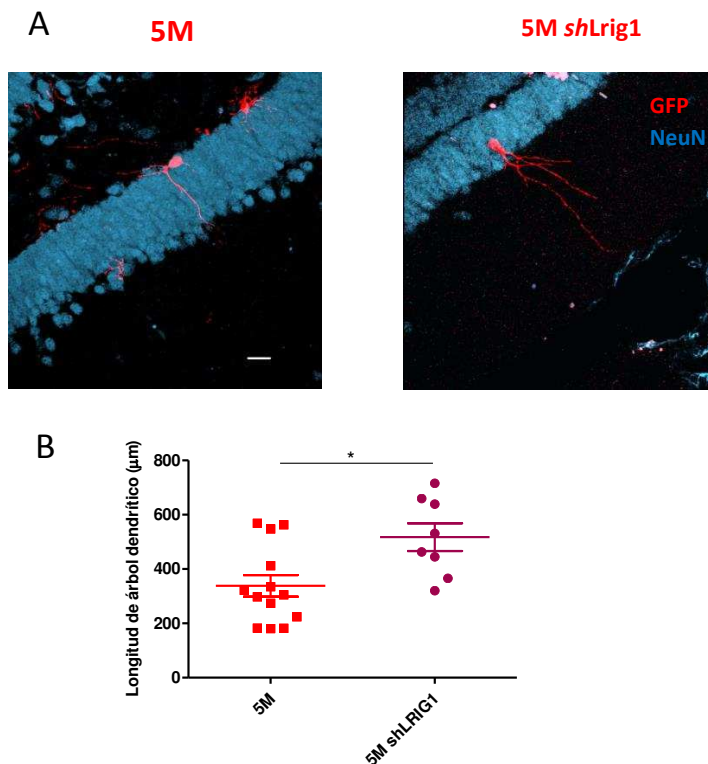


Figura 32. Efecto de la disminución de Lrig1 en el árbol dendrítico de neuronas nacidas en animales de 5M. A. Ejemplos de neuronas de 21 dpi nacidas en ratones de 5M (panel izquierdo) y 5M que expresan el *shLrig1* (panel derecho) (Escala = $20 \mu\text{m}$). B. Longitud del árbol dendrítico de 21 dpi nacidas en ratones de 5M y 5M que expresan el *shLrig1*. Se grafica la dispersión de los puntos (cada punto corresponde a una neurona analizada) y el promedio \pm SEM de un N=4 para ambas condiciones. Se realizó un t-test (*) $p < 0.05$.

Estos datos indican que a pesar de los bajos niveles de BDNF en el hipocampo (como sucede en animales envejecidos), un aumento de la disponibilidad del receptor TrkB puede llevar a la regulación de la dendritogénesis y aumentar la longitud de los árboles dendríticos de neuronas nacidas en ratones de 5M.

6. Conclusiones y Discusión

En esta segunda parte de la tesis se estudiaron distintos factores que modulan la tasa de maduración de las neuronas nacidas en animales envejecidos. La actividad del hipocampo se encuentra asociada a la locomoción (Foster et al., 1989; Vanderwolf, 1969) y la tasa de disparo neuronal aumenta con la velocidad del ejercicio (Czurko et al., 1999; Maurer et al., 2005). Es por esto que se utilizó el ejercicio físico como estímulo fisiológico para activar el circuito hipocampal. Se mostró que el ejercicio voluntario acelera la tasa de maduración de las neuronas nacidas en ratones de envejecidos. Este efecto es mucho más marcado en las neuronas nuevas nacidas en ratones de 8M. Los efectos del ejercicio físico sobre la neurogénesis ya han sido reportados tanto en animales jóvenes como envejecidos. El ejercicio voluntario aumenta la tasa de neurogénesis (Kohman et al., 2011; Overall et al., 2013; van Praag et al., 2005) incluso en ratones viejos (de 18 meses de vida) (Kannangara et al., 2011). Aún se investiga la relación entre la actividad física y el efecto neurogénico. En un trabajo analizaron el número de neuronas nuevas en ratones deficientes en triptófano hidroxilasa-2, enzima limitante de la biosíntesis de serotonina. Cuando estos ratones corren no se observa un aumento de la neurogénesis inducida por ejercicio físico. Esto indicaría un rol crucial de la serotonina en el incremento de la neurogénesis mediada por ejercicio (Klempin et al., 2013). Sin embargo todavía quedan muchos interrogantes por responder sobre el mecanismo por el cual correr aumenta el número de neuronas nuevas en el hipocampo. Existe una correlación entre el ejercicio físico, el aumento consecuente de la neurogénesis y una mejora de la performance cognitiva (Kempermann et al., 2002; Leal-Galicia et al., 2008). Ratones corredores mejoran su performance en el Morris Water Maze (van Praag et al., 2005) y tienen más desarrollada la capacidad de separar patrones similares (Creer et al., 2010).

Por otro lado el ejercicio acelera la maduración de las neuronas nuevas de 21 dpi nacidas en el polo temporal del hipocampo de animales. Estas neuronas presentan características más

maduras que las nacidas en ratones sedentarios de la misma edad. Esta aceleración del desarrollo correlaciona con un aumento en la actividad del circuito local medida por el marcador ARC (Piatti et al 2011).

Además de la actividad eléctrica del hipocampo, el BDNF está implicado en los procesos que median los efectos del ejercicio físico. Se sabe que cuando los animales corren los niveles de BDNF y su receptor TrkB aumentan (Adlard et al., 2005; Cotman and Berchtold, 2002; Farmer et al.; Winter et al., 2007; Wu et al., 2008). En un trabajo reciente se mostró que el efecto dendritogénico ejercido por el ejercicio físico depende de la expresión de BDNF y su acción autócrina sobre las dendritas (Wang et al., 2015). Los niveles de mensajero y proteína de BDNF se encuentran disminuidos en animales envejecidos (Hattiangady et al., 2005; Schaaf et al., 2001) pero se desconocía si los niveles de BDNF también se encuentran reducidos en animales de 5M y 8M. Es por esto que se midieron los niveles proteicos de este factor neurotrófico en los distintos grupos experimentales. Se observó que a medida que el ratón envejece los niveles de BDNF disminuyen. En concordancia con la bibliografía antes mencionada, en los grupos 5MC y 8MC los niveles proteicos de BDNF en el hipocampo aumentan. La aceleración observada en el desarrollo neuronal en ratones de 5MC y 8MC correlaciona con un aumento de este factor neurotrófico.

El marcado efecto que ejerce la actividad física sobre el desarrollo de las CGs nacidas en ratones de 8M implica que estas neuronas son más sensibles a la modulación por *running* que las nacidas en ratones de 2M (Piatti et al., 2011) y 5M.

Se podrían plantear tres escenarios posibles que expliquen la elevada sensibilidad al ejercicio físico de las neuronas nacidas en ratones de 8M.

1) Los niveles proteicos de BDNF se encuentran reducidos en ratones de mediana edad. Esto podría generar como mecanismo compensatorio un aumento celular de la expresión del receptor TrkB o alternativamente un aumento de la sensibilidad por su ligando. Cuando el ratón corre, los niveles de BDNF aumentan y debido a mecanismos compensatorios por parte de las CGs nuevas nacidas en ratones de 8M, el factor neurotrófico tendría un efecto potenciado en el desarrollo neuronal.

Para probar esta hipótesis podría realizarse una inmunofluorescencia anti TrkB y comparar semicuantitativamente la colocalización del mismo con neuronas GFP⁺ nacidas en animales de 2M

(que presentan un ambiente con elevados niveles de BDNF) y ratones de 8M. De esta forma se podría investigar la expresión de este receptor en estos dos grupos experimentales y descifrar un impacto diferencial del aumento de BDNF provocado por el ejercicio físico en las CGs nuevas.

2) Durante la segunda semana de desarrollo neuronal las CGs reciben aferencia GABAérgica que las despolariza (Espósito et al., 2005). Además cuando el ratón corre aumentan mecanismos locales inhibitorios. De hecho el estrés induce la expresión de genes de expresión temprana en interneuronas PV⁺ y Somatostatina⁺ sólo en aquellos ratones que realizan ejercicio físico (Schoenfeld et al., 2013). Es posible que el ejercicio físico aumente la liberación de GABA por interneuronas del circuito local. Esto generaría un mayor grado de despolarización de las neuronas en desarrollo y se dispararía la aceleración de la maduración por un aumento de actividad.

Realizar registros electrofisiológicos de neuronas inmaduras nacidas en animales de 8MC respondería al interrogante de si estas CGs poseen mayor proporción de despolarización mediada por GABA que aquellas neuronas nacidas en animales sedentarios.

3) También sería factible que una baja tasa de neurogénesis en ratones de 8M genere una disminución en la competencia entre las CGs para ser reclutadas al circuito. Las CGs poseen una baja tasa de disparo. Esto se debe a circuitos inhibitorios que proveen fuertes inhibiciones de tipo *"feedforward"* y *"feedback"* (Ewell and Jones, 2010). Es lógico deducir entonces que una reducida tasa de neurogénesis genera una disminución en la activación de circuitos inhibitorios y por ende una mayor probabilidad de reclutamiento de las neuronas en desarrollo del giro dentado. Podría plantearse que una baja competencia por integrarse al circuito frente a un estímulo implica una mayor rapidez de incorporación al mismo. Esto tiene coherencia con datos previos del laboratorio que muestran que en un animal de 2M el ejercicio físico sólo acelera la tasa de maduración en el polo temporal del hipocampo, en donde hay menos neurogénesis (Piatti et al., 2011).

Esta elevada capacidad de modulación por ejercicio físico de las CGs nuevas le otorga a un hipocampo con una baja tasa de neurogénesis, unidades con elevada plasticidad listas para integrarse rápidamente ante una posible demanda.

Como resultado del segundo objetivo se obtuvo una aceleración del crecimiento del árbol dendrítico y de sus ramificaciones al aumentar la actividad intrínseca de las neuronas de 21 dpi de ratones de 5 meses. De esta forma se demostró la importancia de la actividad autónoma de célula

independientemente de la actividad eléctrica local y del ambiente en el que se desarrollan las CGs (que presenta bajos niveles de BDNF). El grupo de Kuipers estimuló con un protocolo de estimulación de alta frecuencia la vía perforante e indujo de esta forma la expresión de ARC en la capa granular del giro dentado. Las neuronas que expresaban este gen lograron una mayor sobrevivencia. Esto demuestra que la actividad intrínseca también es relevante para la sobrevivencia neuronal (Kuipers et al., 2009). También se observó una mayor supervivencia en neuronas que expresan otros genes de expresión temprana como Zif 268 o c-Fos (Tashiro et al., 2007). Además la actividad eléctrica de la célula es fundamental para su completo desarrollo (Piatti et al., 2011).

El aumento de la actividad intrínseca de las neuronas nuevas nacidas en animales envejecidos y su consecuente aceleración del desarrollo reportado en esta tesis refuerza el concepto de que estas neuronas poseen plasticidad autónoma.

Por último un aumento de la vía de la señalización de BDNF modula la dendritogénesis de las neuronas nacidas en animales de 5M. Una disminución de Lrig1 incrementa la longitud del árbol dendrítico de las CGs nuevas en animales envejecidos. De acuerdo a los datos observados Lrig1 estaría actuando como un inhibidor celular de la dendritogénesis aumentando la disponibilidad del receptor del BDNF.

Se sabe que la familia de LRRs (de la cual Lrig1 forma parte) controla efectos de crecimiento dendrítico y sinaptogénesis (Chen et al., 2012; Proenca et al., 2011; de Wit et al., 2011). En *C. elegans* DMA-1, otro miembro de la familia de LRRs, promueve el crecimiento dendrítico (Liu and Shen, 2012). En particular Lrig1 es una proteína transmembrana que se une a receptores TrkB y regula los efectos del factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento del hepatocito (HGF) y del factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF). Esta regulación estaría mediada por ubiquitinación y degradación del receptor al cual Lrig1 se encuentra unido (Gur et al., 2004; Laederich et al., 2004; Ledda et al., 2008; Shattuck et al., 2007). De estos datos surge la importancia de la existencia de moduladores que regulan los efectos tróficos de los distintos factores de crecimiento. De hecho se ha reportado la ausencia de Lrig1 en distintas líneas de células tumorales humanas, lo cual indicaría además una función como supresor de tumores (Hedman et al., 2002). Esta proteína ha sido descubierta y caracterizada hace poco más de diez años por lo que sus funciones no están completamente esclarecidas.

El análisis en conjunto de los tres objetivos propuestos permite concluir que la neurogénesis en el envejecimiento mantiene la capacidad de ser modulada tanto por factores extrínsecos, (aumento de la actividad y del BDNF por el ejercicio físico) como intrínsecos (actividad propia y su capacidad de ser modulada por factores tróficos).

Ante la idea de que durante el envejecimiento se pierde capacidad adaptativa, los datos presentados en esta tesis dan lugar al concepto de que el cerebro, aunque envejecido, conserva altos niveles de plasticidad neuronal.

Discusión general

En el cerebro adulto de los mamíferos se generan continuamente CGs en la SGZ del giro dentado y se incorporan a los circuitos preexistentes (van Praag et al., 2002; Ming and Song, 2005; Zhao et al., 2008). Estas neuronas nuevas contribuyen a funciones cognitivas como aprendizaje espacial y separación de patrones (la habilidad que tiene el giro dentado de transformar experiencias muy similares en representaciones distinguibles) (Abrous et al., 2005; Aimone et al., 2011; Clelland et al., 2009; Nakashiba et al., 2012; Sahay et al., 2011). Las funciones fisiológicas de las CGs nuevas dependen directamente del desarrollo dendrítico y axonal que es requerido para su correcta integración al circuito hipocampal. Es por esto que es necesario entender el desarrollo progresivo y los mecanismos modulatorios de la morfogénesis de las neuronas nacidas en el hipocampo.

La idea de que el nicho en el cual se desarrollan las neuronas tiene un rol crucial se ilustra en el trabajo de Villeda y colaboradores (Villeda et al., 2011). Este grupo investigó el rol de los factores que se encuentran en el sistema circulatorio en la neurogénesis de ratones jóvenes y viejos utilizando la técnica de parabiosis. La misma consiste en unir quirúrgicamente dos organismos de modo tal que el sistema circulatorio es compartido. Al realizar parabiosis entre un ratón viejo y uno joven se observó que aumenta la neurogénesis en el hipocampo envejecido y disminuye en el joven. Además, esta tesis aporta datos que indican una disminución de la actividad eléctrica y una reducción de los niveles de BDNF en el hipocampo envejecido sugiriendo en conjunto un rol esencial del ambiente en el cual se desarrollan las neuronas nuevas.

La ralentización observada en la maduración de las neuronas nuevas del giro dentado de ratones viejos genera una incógnita interesante: ¿representa este fenómeno una ventaja adaptativa para el circuito o simplemente forma parte del efecto de la senescencia en esta área del cerebro? Experimentos a futuro utilizando paradigmas comportamentales permitirán dilucidar si el efecto del envejecimiento en las CGs nuevas es funcionalmente beneficioso (otorgándole al circuito CGs altamente plásticas) o perjudicial.

Resulta notable el efecto del ejercicio físico en neuronas nacidas en el grupo más envejecido y que presentaba un fuerte efecto en las neuronas nuevas (8M). Es interesante además

que durante el envejecimiento, el cerebro mantiene la habilidad de responder a la actividad física. Dadas las múltiples consecuencias de la neurodegeneración asociadas a la edad en el contexto de una población anciana creciente, es de sumo interés investigar posibles formas de paliar o revertir los efectos del envejecimiento. El ejercicio físico es un factor clave en humanos para prevenir la demencia y los daños cognitivos propios de una edad avanzada (Cotman et al., 2007; Kiraly and Kiraly, 2005). En roedores, el ambiente enriquecido (conteniendo muchas veces en su interior una rueda) también ha demostrado mejorar las funciones cognitivas tanto en animales jóvenes como en viejos (Duffy et al.; Kempermann et al., 2002).

Mediante la utilización de RASSLs se logró aumentar la actividad de las CGs nuevas y se observó una aceleración de su maduración. Más aún, datos preliminares sugieren que disminuir el modulador negativo de BDNF, Lrig1, en forma autónoma de célula ejerce un efecto dendritogénico. De esta forma se entiende tanto a la actividad circuital como a la actividad propia de la célula como dos pilares claves en el desarrollo neuronal y en la capacidad de las CGs de adaptarse a distintos estímulos.

Con la edad la neurogénesis disminuye en varias especies de mamíferos (Cameron and McKay, 1999; Gould et al., 1999; Kempermann et al., 2002; McDonald and Wojtowicz, 2005; Seki and Arai, 1995) y dado que en el envejecimiento se produce una caída de la performance cognitiva (Barnes, 1979; Gage et al., 1984), esta se podría explicar parcialmente por la falta de neuronas nuevas. Existen varios estudios en donde una disminución de la neurogénesis en roedores correlaciona con una disminución en la performance de tareas que involucran al hipocampo. Sin embargo en humanos se demostró recientemente que la neurogénesis no sufre un decaimiento similar al observado en otras especies sino que sigue un curso constante a lo largo de la vida (Spalding et al., 2013). Además se estudió la neurogénesis en ratones en la naturaleza y también se descubrió que la misma se mantiene constante a lo largo de la vida (Barker et al., 2005; Epp et al., 2009). Esto implica que tal vez la hipótesis de que una disminución en la neurogénesis podría explicar en parte la reducción en la plasticidad circuital y por ende los déficits cognitivos observados podría no ser cierta. Dado que la neurogénesis se mantiene constante a lo largo de la vida del humano, deben existir otros mecanismos subyacentes a la disminución en la performance cognitiva observada en el envejecimiento.

Ya en la edad mediana humana (34 a 53 años) se empiezan a observar déficits en el aprendizaje (Feeney et al., 2002) y a medida que la persona envejece estos efectos son más pronunciados (Howard and Howard, 1997). Esto sugiere un deterioro progresivo en el aprendizaje a lo largo de la vida adulta. La proporción de sujetos mayores de 70 años diagnosticados con demencia (patología en la que se encuentra involucrada el hipocampo) constituye el 14% (Wagster et al., 2012). Es por esto que resulta crítico entender los procesos normales del envejecimiento. Una mayor comprensión del funcionamiento del cerebro en senescencia no sólo podría mejorar la calidad de vida durante el envejecimiento, sino que permitiría encontrar mecanismos que puedan prevenir o paliar patologías que ocurren en esas etapas de la vida.

Bibliografía

Ben Abdallah, N.M.-B., Slomianka, L., Vyssotski, A.L., and Lipp, H.-P. (2010). Early age-related changes in adult hippocampal neurogenesis in C57 mice. *Neurobiol. Aging* *31*, 151–161.

Abrous, D.N., Koehl, M., and Le Moal, M. (2005). Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev.* *85*, 523–569.

Adlard, P.A., Perreau, V.M., and Cotman, C.W. (2005). The exercise-induced expression of BDNF within the hippocampus varies across life-span. *Neurobiol. Aging* *26*, 511–520.

Aimone, J.B., Deng, W., and Gage, F.H. (2011). Resolving new memories: a critical look at the dentate gyrus, adult neurogenesis, and pattern separation. *Neuron* *70*, 589–596.

Alexander, G.M., Rogan, S.C., Abbas, A.I., Armbruster, B.N., Pei, Y., Allen, J.A., Nonneman, R.J., Hartmann, J., Moy, S.S., Nicolelis, M.A., et al. (2009). Remote control of neuronal activity in transgenic mice expressing evolved G protein-coupled receptors. *Neuron* *63*, 27–39.

Altman, J. (1963). Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *Anat.Rec.* *145*, 573–591.

Alvarez, P., and Squire, L.R. (1994). Memory consolidation and the medial temporal lobe: a simple network model. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *91*, 7041–7045.

Amaral, D.G., and Witter, M.P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* *31*, 571–591.

Ambrogini, P., Lattanzi, D., Ciuffoli, S., Agostini, D., Bertini, L., Stocchi, V., Santi, S., and Cuppini, R. (2004). Morpho-functional characterization of neuronal cells at different stages of maturation in granule cell layer of adult rat dentate gyrus. *Brain Res.* *1017*, 21–31.

Ben Ari, Y. (2002). Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat.Rev.Neurosci.* *3*, 728–739.

Armbruster, B.N., Li, X., Pausch, M.H., Herlitze, S., and Roth, B.L. (2007). Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potentially activated by an inert ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 5163–5168.

Barker, J.M., Wojtowicz, J.M., and Boonstra, R. (2005). Where's my dinner? Adult neurogenesis in free-living food-storing rodents. *Genes Brain Behav.* *4*, 89–98.

Barnes, C.A. (1979). Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* *93*, 74–104.

Bender, D., Holschbach, M., and Stöcklin, G. (1994). Synthesis of n.c.a. carbon-11 labelled clozapine and its major metabolite clozapine-N-oxide and comparison of their biodistribution in mice. *Nucl. Med. Biol.* *21*, 921–925.

Bergami, M., Rimondini, R., Santi, S., Blum, R., Gotz, M., and Canossa, M. (2008). Deletion of TrkB in adult progenitors alters newborn neuron integration into hippocampal circuits and increases anxiety-like behavior. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 105, 15570–15575.

Bondolfi, L., Ermini, F., Long, J.M., Ingram, D.K., and Jucker, M. (2004). Impact of age and caloric restriction on neurogenesis in the dentate gyrus of C57BL/6 mice. *Neurobiol. Aging* 25, 333–340.

Boulanger, L., and Poo, M.M. (1999). Presynaptic depolarization facilitates neurotrophin-induced synaptic potentiation. *Nat.Neurosci.* 2, 346–351.

Burns, P.C. (1999). Navigation and the mobility of older drivers. *J. Gerontol. B. Psychol. Sci. Soc. Sci.* 54, S49–S55.

Caldeira, M. V, Melo, C. V, Pereira, D.B., Carvalho, R.F., Carvalho, A.L., and Duarte, C.B. (2007). BDNF regulates the expression and traffic of NMDA receptors in cultured hippocampal neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 35, 208–219.

Cameron, H.A., and McKay, R.D. (1999). Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nat.Neurosci.* 2, 894–897.

Cameron, H.A., and McKay, R.D. (2001). Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J.Comp Neurol.* 435, 406–417.

Chan, J.P., Cordeira, J., Calderon, G.A., Iyer, L.K., and Rios, M. (2008). Depletion of central BDNF in mice impedes terminal differentiation of new granule neurons in the adult hippocampus. *Mol.Cell Neurosci.* 39, 372–383.

Chen, W.G., Chang, Q., Lin, Y., Meissner, A., West, A.E., Griffith, E.C., Jaenisch, R., and Greenberg, M.E. (2003). Derepression of BDNF transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MeCP2. *Science* (80-). 302, 885–889.

Chen, Y., Hor, H.H., and Tang, B.L. (2012). AMIGO is expressed in multiple brain cell types and may regulate dendritic growth and neuronal survival. *J. Cell. Physiol.* 227, 2217–2229.

Clayton, N.S., and Krebs, J.R. (1994). Hippocampal growth and attrition in birds affected by experience. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 7410–7414.

Clelland, C.D., Choi, M., Romberg, C., Clemenson Jr., G.D., Fagniere, A., Tyers, P., Jessberger, S., Saksida, L.M., Barker, R.A., Gage, F.H., et al. (2009). A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science* (80-). 325, 210–213.

Cotman, C.W., and Berchtold, N.C. (2002). Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci.* 25, 295–301.

Cotman, C.W., Berchtold, N.C., and Christie, L.-A. (2007). Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends Neurosci.* 30, 464–472.

- Czurko, A., Hirase, H., Csicsvari, J., and Buzsaki, G. (1999). Sustained activation of hippocampal pyramidal cells by “space clamping” in a running wheel. *Eur.J.Neurosci.* *11*, 344–352.
- Dieni, C. V., Nietz, A.K., Panichi, R., Wadiche, J.I., and Overstreet-Wadiche, L. (2013). Distinct determinants of sparse activation during granule cell maturation. *J Neurosci* *33*, 19131–19142.
- Dolorfo, C.L., and Amaral, D.G. (1998a). Entorhinal cortex of the rat: topographic organization of the cells of origin of the perforant path projection to the dentate gyrus. *J.Comp Neurol.* *398*, 25–48.
- Dolorfo, C.L., and Amaral, D.G. (1998b). Entorhinal cortex of the rat: organization of intrinsic connections. *J.Comp Neurol.* *398*, 49–82.
- Driscoll, I., Hamilton, D.A., Yeo, R.A., Brooks, W.M., and Sutherland, R.J. (2005). Virtual navigation in humans: the impact of age, sex, and hormones on place learning. *Horm. Behav.* *47*, 326–335.
- Duffy, S.N., Craddock, K.J., Abel, T., and Nguyen, P. V Environmental enrichment modifies the PKA-dependence of hippocampal LTP and improves hippocampus-dependent memory. *Learn. Mem.* *8*, 26–34.
- Dunaevsky, A., Tashiro, A., Majewska, A., Mason, C., and Yuste, R. (1999). Developmental regulation of spine motility in the mammalian central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 13438–13443.
- Dupret, D., Revest, J.M., Koehl, M., Ichas, F., De Giorgi, F., Costet, P., Abrous, D.N., and Piazza, P. V (2008). Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PLoS.ONE.* *3*, e1959.
- Edelmann, E., Cepeda-Prado, E., Franck, M., Lichtenecker, P., Brigadski, T., and Leßmann, V. (2015). Theta Burst Firing Recruits BDNF Release and Signaling in Postsynaptic CA1 Neurons in Spike-Timing-Dependent LTP. *Neuron* *86*, 1041–1054.
- Eichenbaum, H., Dudchenko, P., Wood, E., Shapiro, M., and Tanila, H. (1999). The hippocampus, memory, and place cells: is it spatial memory or a memory space? *Neuron* *23*, 209–226.
- Ekstrom, A.D., Kahana, M.J., Caplan, J.B., Fields, T.A., Isham, E.A., Newman, E.L., and Fried, I. (2003). Cellular networks underlying human spatial navigation. *Nature* *425*, 184–188.
- Epp, J.R., Barker, J.M., and Galea, L.A.M. (2009). Running wild: neurogenesis in the hippocampus across the lifespan in wild and laboratory-bred Norway rats. *Hippocampus* *19*, 1040–1049.
- Ergorul, C., and Eichenbaum, H. (2004). The hippocampus and memory for “what,” “where,” and “when.” *Learn.Mem.* *11*, 397–405.
- Erickson, K.I., Prakash, R.S., Voss, M.W., Chaddock, L., Heo, S., McLaren, M., Pence, B.D., Martin, S.A., Vieira, V.J., Woods, J.A., et al. (2010). Brain-derived neurotrophic factor is associated with age-related decline in hippocampal volume. *J. Neurosci.* *30*, 5368–5375.

- Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A., and Gage, F.H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat.Med.* 4, 1313–1317.
- Espósito, M.S., Piatti, V.C., Laplagne, D.A., Morgenstern, N.A., Ferrari, C.C., Pitossi, F.J., and Schinder, A.F. (2005). Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *J.Neurosci.* 25, 10074–10086.
- Ewell, L.A., and Jones, M. V (2010). Frequency-tuned distribution of inhibition in the dentate gyrus. *J Neurosci* 30, 12597–12607.
- Farmer, J., Zhao, X., van Praag, H., Wodtke, K., Gage, F.H., and Christie, B.R. Effects of voluntary exercise on synaptic plasticity and gene expression in the dentate gyrus of adult male sprague-dawley rats in vivo. *Neuroscience In Press*, .
- Fazeli, M.S., Corbet, J., Dunn, M.J., Dolphin, A.C., and Bliss, T. V (1993). Changes in protein synthesis accompanying long-term potentiation in the dentate gyrus in vivo. *J. Neurosci.* 13, 1346–1353.
- Feeney, J.J., Howard, J.H., and Howard, D. V (2002). Implicit learning of higher order sequences in middle age. *Psychol. Aging* 17, 351–355.
- Fischer, M., Kaech, S., Knutti, D., and Matus, A. (1998). Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron* 20, 847–854.
- Foster, T.C., Castro, C.A., and McNaughton, B.L. (1989). Spatial selectivity of rat hippocampal neurons: dependence on preparedness for movement. *Science* (80-.). 244, 1580–1582.
- Gage, F.H., Dunnett, S.B., and Björklund, A. (1984). Spatial learning and motor deficits in aged rats. *Neurobiol. Aging* 5, 43–48.
- Gallagher, M., Landfield, P.W., McEwen, B., Meaney, M.J., Rapp, P.R., Sapolsky, R., and West, M.J. (1996). Hippocampal neurodegeneration in aging. *Science* 274, 484–485.
- Gärtner, A., Polnau, D.G., Staiger, V., Sciarretta, C., Minichiello, L., Thoenen, H., Bonhoeffer, T., and Korte, M. (2006). Hippocampal long-term potentiation is supported by presynaptic and postsynaptic tyrosine receptor kinase B-mediated phospholipase Cgamma signaling. *J. Neurosci.* 26, 3496–3504.
- Ge, S., Pradhan, D.A., Ming, G.L., and Song, H. (2006a). GABA sets the tempo for activity-dependent adult neurogenesis. *Trends Neurosci.*
- Ge, S., Goh, E.L., Sailor, K.A., Kitabatake, Y., Ming, G.L., and Song, H. (2006b). GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature* 439, 589–593.
- Ge, S., Yang, C.H., Hsu, K.S., Ming, G.L., and Song, H. (2007). A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron* 54, 559–566.

- Geinisman, Y., deToledo-Morrell, L., Morrell, F., Persina, I.S., and Rossi, M. (1992). Age-related loss of axospinous synapses formed by two afferent systems in the rat dentate gyrus as revealed by the unbiased stereological disector technique. *Hippocampus* 2, 437–444.
- Gould, E., Reeves, A.J., Fallah, M., Tanapat, P., Gross, C.G., and Fuchs, E. (1999). Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 5263–5267.
- Greenberg, M.E., Xu, B., Lu, B., and Hempstead, B.L. (2009). New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function. *J. Neurosci.* 29, 12764–12767.
- Gur, G., Rubin, C., Katz, M., Amit, I., Citri, A., Nilsson, J., Amariglio, N., Henriksson, R., Rechavi, G., Hedman, H., et al. (2004). LRIG1 restricts growth factor signaling by enhancing receptor ubiquitylation and degradation. *EMBO J.* 23, 3270–3281.
- Hartmann, M., Heumann, R., and Lessmann, V. (2001). Synaptic secretion of BDNF after high-frequency stimulation of glutamatergic synapses. *EMBO J.* 20, 5887–5897.
- Hattiangady, B., and Shetty, A.K. (2008). Aging does not alter the number or phenotype of putative stem/progenitor cells in the neurogenic region of the hippocampus. *Neurobiol. Aging* 29, 129–147.
- Hattiangady, B., Rao, M.S., Shetty, G.A., and Shetty, A.K. (2005). Brain-derived neurotrophic factor, phosphorylated cyclic AMP response element binding protein and neuropeptide Y decline as early as middle age in the dentate gyrus and CA1 and CA3 subfields of the hippocampus. *Exp. Neurol.* 195, 353–371.
- Head, D., and Isom, M. (2010). Age effects on wayfinding and route learning skills. *Behav. Brain Res.* 209, 49–58.
- Hedman, H., Nilsson, J., Guo, D., and Henriksson, R. (2002). Is LRIG1 a tumour suppressor gene at chromosome 3p14.3? *Acta Oncol.* 41, 352–354.
- Heine, V.M., Maslam, S., Joëls, M., and Lucassen, P.J. (2004). 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.
- Holtmaat, A., Wilbrecht, L., Knott, G.W., Welker, E., and Svoboda, K. (2006). Experience-dependent and cell-type-specific spine growth in the neocortex. *Nature* 441, 979–983.
- Holtmaat, A.J., Trachtenberg, J.T., Wilbrecht, L., Shepherd, G.M., Zhang, X., Knott, G.W., and Svoboda, K. (2005). Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo. *Neuron* 45, 279–291.
- Horch, H.W., Krüttgen, A., Portbury, S.D., and Katz, L.C. (1999). Destabilization of cortical dendrites and spines by BDNF. *Neuron* 23, 353–364.
- Howard, J.H., and Howard, D. V (1997). Age differences in implicit learning of higher order dependencies in serial patterns. *Psychol. Aging* 12, 634–656.

- Ji, Y., Lu, Y., Yang, F., Shen, W., Tang, T.T.-T., Feng, L., Duan, S., and Lu, B. (2010). Acute and gradual increases in BDNF concentration elicit distinct signaling and functions in neurons. *Nat. Neurosci.* *13*, 302–309.
- Jin, X., Hu, H., Mathers, P.H., and Agmon, A. (2003). Brain-derived neurotrophic factor mediates activity-dependent dendritic growth in nonpyramidal neocortical interneurons in developing organotypic cultures. *J. Neurosci.* *23*, 5662–5673.
- Kannangara, T.S., Lucero, M.J., Gil-Mohapel, J., Drapala, R.J., Simpson, J.M., Christie, B.R., and van Praag, H. (2011). Running reduces stress and enhances cell genesis in aged mice. *Neurobiol. Aging* *32*, 2279–2286.
- Karten, Y.J., Jones, M.A., Jeurling, S.I., and Cameron, H.A. (2006). GABAergic signaling in young granule cells in the adult rat and mouse dentate gyrus. *Hippocampus* *16*, 312–320.
- Kempermann, G., Kuhn, H.G., and Gage, F.H. (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* *386*, 493–495.
- Kempermann, G., Kuhn, H.G., and Gage, F.H. (1998). Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J. Neurosci.* *18*, 3206–3212.
- Kempermann, G., Gast, D., and Gage, F.H. (2002). Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. *Ann. Neurol.* *52*, 135–143.
- Keuker, J.I.H., Luiten, P.G.M., and Fuchs, E. Preservation of hippocampal neuron numbers in aged rhesus monkeys. *Neurobiol. Aging* *24*, 157–165.
- Kiraly, M.A., and Kiraly, S.J. (2005). The effect of exercise on hippocampal integrity: review of recent research. *Int. J. Psychiatry Med.* *35*, 75–89.
- Klempin, F., Beis, D., Mosienko, V., Kempermann, G., Bader, M., and Alenina, N. (2013). Serotonin is required for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. *J. Neurosci.* *33*, 8270–8275.
- Kohman, R.A., Rodriguez-Zas, S.L., Southey, B.R., Kelley, K.W., Dantzer, R., and Rhodes, J.S. (2011). Voluntary wheel running reverses age-induced changes in hippocampal gene expression. *PLoS One* *6*.
- Kuczewski, N., Porcher, C., Ferrand, N., Fiorentino, H., Pellegrino, C., Kolarow, R., Lessmann, V., Medina, I., and Gaiarsa, J.L. (2008). Backpropagating action potentials trigger dendritic release of BDNF during spontaneous network activity. *J. Neurosci.* *28*, 7013–7023.
- Kuhn, H.G., Dickinson-Anson, H., and Gage, F.H. (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J. Neurosci.* *16*, 2027–2033.
- Kuipers, S.D., Tiron, A., Soule, J., Messaoudi, E., Trentani, A., and Bramham, C.R. (2009). Selective survival and maturation of adult-born dentate granule cells expressing the immediate early gene *Arc/Arg3.1*. *PLoS ONE.* *4*, e4885.

- Laederich, M.B., Funes-Duran, M., Yen, L., Ingalla, E., Wu, X., Carraway, K.L., and Sweeney, C. (2004). The leucine-rich repeat protein LRIG1 is a negative regulator of ErbB family receptor tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 279, 47050–47056.
- Laplagne, D.A., Espósito, M.S., Piatti, V.C., Morgenstern, N.A., Zhao, C., van Praag, H., Gage, F.H., and Schinder, A.F. (2006). Functional convergence of neurons generated in the developing and adult hippocampus. *PLoS.Biol.* 4, e409.
- Laplagne, D.A., Kamienkowski, J.E., Espósito, M.S., Piatti, V.C., Zhao, C., Gage, F.H., and Schinder, A.F. (2007). Similar GABAergic inputs in dentate granule cells born during embryonic and adult neurogenesis. *Eur.J.Neurosci.* 25, 2973–2981.
- Ledda, F., Bieraugel, O., Fard, S.S., Vilar, M., and Paratcha, G. (2008). Lrig1 is an endogenous inhibitor of Ret receptor tyrosine kinase activation, downstream signaling, and biological responses to GDNF. *J. Neurosci.* 28, 39–49.
- Lee, S.W., Clemenson, G.D., and Gage, F.H. (2012). New neurons in an aged brain. *Behav. Brain Res.* 227, 497–507.
- Lepousez, G., Nissant, A., and Lledo, P.-M. (2015). Adult Neurogenesis and the Future of the Rejuvenating Brain Circuits. *Neuron* 86, 387–401.
- Leutgeb, J.K., Leutgeb, S., Treves, A., Meyer, R., Barnes, C.A., McNaughton, B.L., Moser, M.B., and Moser, E.I. (2005). Progressive transformation of hippocampal neuronal representations in “morphed” environments. *Neuron* 48, 345–358.
- Liu, O.W., and Shen, K. (2012). The transmembrane LRR protein DMA-1 promotes dendrite branching and growth in *C. elegans*. *Nat. Neurosci.* 15, 57–63.
- Lledo, P.M., Alonso, M., and Grubb, M.S. (2006). Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat.Rev.Neurosci.* 7, 179–193.
- Lucin, K.M., and Wyss-Coray, T. (2009). Immune Activation in Brain Aging and Neurodegeneration: Too Much or Too Little? *Neuron* 64, 110–122.
- Ma, D.K., Kim, W.R., Ming, G.L., and Song, H. (2009). Activity-dependent extrinsic regulation of adult olfactory bulb and hippocampal neurogenesis. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1170, 664–673.
- Madsen, T.M., Kristjansen, P.E., Bolwig, T.G., and Wortwein, G. (2003). Arrested neuronal proliferation and impaired hippocampal function following fractionated brain irradiation in the adult rat. *Neuroscience* 119, 635–642.
- Marin-Burgin, A., Mongiat, L.A., Pardi, M.B., and Schinder, A.F. (2012). Unique processing during a period of high excitation/inhibition balance in adult-born neurons. *Science* (80-.). 335, 1238–1242.
- Matsuda, N., Lu, H., Fukata, Y., Noritake, J., Gao, H., Mukherjee, S., Nemoto, T., Fukata, M., and Poo, M.M. (2009). Differential activity-dependent secretion of brain-derived neurotrophic factor from axon and dendrite. *J.Neurosci.* 29, 14185–14198.

- Maurer, A.P., Vanrhoads, S.R., Sutherland, G.R., Lipa, P., and McNaughton, B.L. (2005). Self-motion and the origin of differential spatial scaling along the septo-temporal axis of the hippocampus. *Hippocampus* 15, 841–852.
- McDonald, H.Y., and Wojtowicz, J.M. (2005). Dynamics of neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats. *Neurosci.Lett.* 385, 70–75.
- McKinney, R.A., Capogna, M., Durr, R., Gahwiler, B.H., and Thompson, S.M. (1999). Miniature synaptic events maintain dendritic spines via AMPA receptor activation. *Nat.Neurosci.* 2, 44–49.
- McNaughton, B.L. (1980). Evidence for two physiologically distinct perforant pathways to the fascia dentata. *Brain Res.* 199, 1–19.
- Ming, G.L., and Song, H. (2005). Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu.Rev.Neurosci.* 28, 223–250.
- Moffat, S.D., Elkins, W., and Resnick, S.M. (2006). Age differences in the neural systems supporting human allocentric spatial navigation. *Neurobiol. Aging* 27, 965–972.
- Morgenstern, N.A., Lombardi, G., and Schinder, A.F. (2008). Newborn granule cells in the ageing dentate gyrus. *J.Physiol* 586, 3751–3757.
- Moser, M.B., Moser, E.I., Forrest, E., Andersen, P., and Morris, R.G. (1995). Spatial learning with a minilab in the dorsal hippocampus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92, 9697–9701.
- Nakashiba, T., Cushman, J.D., Pelkey, K.A., Renaudineau, S., Buhl, D.L., McHugh, T.J., Barrera, V.R., Chittajallu, R., Iwamoto, K.S., McBain, C.J., et al. (2012). Young Dentate Granule Cells Mediate Pattern Separation, whereas Old Granule Cells Facilitate Pattern Completion. *Cell* 149, 188–201.
- Neeper, S.A., Gómez-Pinilla, F., Choi, J., and Cotman, C.W. (1996). Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. *Brain Res.* 726, 49–56.
- Njie, E.G., Boelen, E., Stassen, F.R., Steinbusch, H.W.M., Borchelt, D.R., and Streit, W.J. (2012). Ex vivo cultures of microglia from young and aged rodent brain reveal age-related changes in microglial function. *Neurobiol. Aging* 33, 195.e1–e12.
- Overall, R.W., Walker, T.L., Leiter, O., Lenke, S., Ruhwald, S., and Kempermann, G. (2013). Delayed and transient increase of adult hippocampal neurogenesis by physical exercise in DBA/2 mice. *PLoS One* 8, e83797.
- Overstreet Wadiche, L.S., Bromberg, D.A., Bensen, A.L., and Westbrook, G.L. (2005). GABAergic signaling to newborn neurons in dentate gyrus. *J.Neurophysiol.* 94 , 4528–4532.
- Overstreet-Wadiche, L.S., and Westbrook, G.L. (2006). Functional maturation of adult-generated granule cells. *Hippocampus* 16, 208–215.
- Overstreet-Wadiche, L.S., Bensen, A.L., and Westbrook, G.L. (2006a). Delayed development of adult-generated granule cells in dentate gyrus. *J.Neurosci.* 26, 2326–2334.

- Overstreet-Wadiche, L.S., Bromberg, D.A., Bensen, A.L., and Westbrook, G.L. (2006b). Seizures accelerate functional integration of adult-generated granule cells. *J. Neurosci.* *26*, 4095–4103.
- Paratcha, G., Ledda, F., Baars, L., Couplier, M., Besset, V., Anders, J., Scott, R., and Ibáñez, C.F. (2001). Released GFR α 1 potentiates downstream signaling, neuronal survival, and differentiation via a novel mechanism of recruitment of c-Ret to lipid rafts. *Neuron* *29*, 171–184.
- Paton, J.A., and Nottebohm, F.N. (1984). Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits. *Science* (80-.). *225*, 1046–1048.
- Piatti, V.C., Davies-Sala, M.G., Esposito, M.S., Mongiat, L.A., Trincherio, M.F., and Schinder, A.F. (2011). The timing for neuronal maturation in the adult hippocampus is modulated by local network activity. *J. Neurosci* *31*, 7715–7728.
- Van Praag, H., Kempermann, G., and Gage, F.H. (1999). Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat. Neurosci.* *2*, 266–270.
- Van Praag, H., Schinder, A.F., Christie, B.R., Toni, N., Palmer, T.D., and Gage, F.H. (2002a). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* *415*, 1030–1034.
- Van Praag, H., Schinder, A.F., Christie, B.R., Toni, N., Palmer, T.D., and Gage, F.H. (2002b). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* *415*, 1030–1034.
- Van Praag, H., Shubert, T., Zhao, C., and Gage, F.H. (2005). Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J. Neurosci.* *25*, 8680–8685.
- Proenca, C.C., Gao, K.P., Shmelkov, S. V, Rafii, S., and Lee, F.S. (2011). Slitrks as emerging candidate genes involved in neuropsychiatric disorders. *Trends Neurosci.* *34*, 143–153.
- Rao, M.S., Hattiangady, B., Abdel-Rahman, A., Stanley, D.P., and Shetty, A.K. (2005). Newly born cells in the ageing dentate gyrus display normal migration, survival and neuronal fate choice but endure retarded early maturation. *Eur. J. Neurosci.* *21*, 464–476.
- Raskind, M.A., Peskind, E.R., and Wilkinson, C.W. (1994). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis regulation and human aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *746*, 327–335.
- Reichardt, L.F. (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *361*, 1545–1564.
- Sahay, A., Wilson, D.A., and Hen, R. (2011). Pattern separation: a common function for new neurons in hippocampus and olfactory bulb. *Neuron* *70*, 582–588.
- Schaaf, M.J.M., Workel, J.O., Lesscher, H.M., Vreugdenhil, E., Oitzl, M.S., and Ron de Kloet, E. (2001). Correlation between hippocampal BDNF mRNA expression and memory performance in senescent rats. *Brain Res.* *915*, 227–233.
- Schinder, A.F., Berninger, B., and Poo, M. (2000). Postsynaptic target specificity of neurotrophin-induced presynaptic potentiation. *Neuron* *25*, 151–163.

- Schmidt-Hieber, C., Jonas, P., and Bischofberger, J. (2004). Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature* 429, 184–187.
- Schoenfeld, T.J., Rada, P., Pieruzzini, P.R., Hsueh, B., and Gould, E. (2013). Physical exercise prevents stress-induced activation of granule neurons and enhances local inhibitory mechanisms in the dentate gyrus. *J. Neurosci.* 33, 7770–7777.
- Scoville, W.B., and Milner, B. (2000). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. 1957. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 12, 103–113.
- Seki, T., and Arai, Y. (1995). Age-related production of new granule cells in the adult dentate gyrus. *Neuroreport* 6, 2479–2482.
- Shattuck, D.L., Miller, J.K., Laederich, M., Funes, M., Petersen, H., Carraway, K.L., and Sweeney, C. (2007). LRIG1 is a novel negative regulator of the Met receptor and opposes Met and Her2 synergy. *Mol. Cell. Biol.* 27, 1934–1946.
- Shen, J., Barnes, C.A., McNaughton, B.L., Skaggs, W.E., and Weaver, K.L. (1997). The effect of aging on experience-dependent plasticity of hippocampal place cells. *J. Neurosci.* 17, 6769–6782.
- Shors, T.J., Townsend, D.A., Zhao, M., Kozorovitskiy, Y., and Gould, E. (2002). Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus* 12, 578–584.
- Small, G.W. Brain-imaging surrogate markers for detection and prevention of age-related memory loss. *J. Mol. Neurosci.* 19, 17–21.
- Smith, T.D., Adams, M.M., Gallagher, M., Morrison, J.H., and Rapp, P.R. (2000). Circuit-specific alterations in hippocampal synaptophysin immunoreactivity predict spatial learning impairment in aged rats. *J. Neurosci.* 20, 6587–6593.
- Song, J., Zhong, C., Bonaguidi, M.A., Sun, G.J., Hsu, D., Gu, Y., Meletis, K., Huang, Z.J., Ge, S., Enikolopov, G., et al. (2012). Neuronal circuitry mechanism regulating adult quiescent neural stem-cell fate decision. *Nature* 489, 150–154.
- Song, J., Sun, J., Moss, J., Wen, Z., Sun, G.J., Hsu, D., Zhong, C., Davoudi, H., Christian, K.M., Toni, N., et al. (2013). Parvalbumin interneurons mediate neuronal circuitry-neurogenesis coupling in the adult hippocampus. *Nat Neurosci* 16, 1728–1730.
- Soya, H., Nakamura, T., Deocaris, C.C., Kimpara, A., Iimura, M., Fujikawa, T., Chang, H., McEwen, B.S., and Nishijima, T. (2007). BDNF induction with mild exercise in the rat hippocampus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358, 961–967.
- Spalding, K.L., Bergmann, O., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Huttner, H.B., Bostrom, E., Westerlund, I., Vial, C., Buchholz, B.A., et al. (2013). Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell* 153, 1219–1227.
- Stein-Behrens, B.A., and Sapolsky, R.M. (1992). Stress, glucocorticoids, and aging. *Aging (Milano)*. 4, 197–210.

- Tashiro, A., Sandler, V.M., Toni, N., Zhao, C., and Gage, F.H. (2006). NMDA-receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus. *Nature* 442, 929–933.
- Tashiro, A., Makino, H., and Gage, F.H. (2007). Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: a critical period during an immature stage. *J. Neurosci.* 27, 3252–3259.
- Temprana, S.G., Mongiat, L.A., Yang, S.M., Trincherro, M.F., Alvarez, D.D., Kropff, E., Giacomini, D., Beltramone, N., Lanuza, G.M., and Schinder, A.F. (2015). Delayed Coupling to Feedback Inhibition during a Critical Period for the Integration of Adult-Born Granule Cells. *Neuron* 85, 116–130.
- Uttl, B., and Graf, P. (1993). Episodic spatial memory in adulthood. *Psychol. Aging* 8, 257–273.
- Vanderwolf, C.H. (1969). Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 26, 407–418.
- Villeda, S.A., Luo, J., Mosher, K.I., Zou, B., Britschgi, M., Bieri, G., Stan, T.M., Fainberg, N., Ding, Z., Eggel, A., et al. (2011). The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature* 477, 90–94.
- Wagster, M. V., King, J.W., Resnick, S.M., and Rapp, P.R. (2012). The 87%: Guest Editorial. *Journals Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* 67, 739–740.
- Wang, L., Chang, X., She, L., Xu, D., Huang, W., and Poo, M.-M. (2015). Autocrine action of BDNF on dendrite development of adult-born hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 35, 8384–8393.
- Waterhouse, E.G., An, J.J., Orefice, L.L., Baydyuk, M., Liao, G.Y., Zheng, K., Lu, B., and Xu, B. (2012). BDNF promotes differentiation and maturation of adult-born neurons through GABAergic transmission. *J Neurosci* 32, 14318–14330.
- West, M.J. Regionally specific loss of neurons in the aging human hippocampus. *Neurobiol. Aging* 14, 287–293.
- Winter, B., Breitenstein, C., Mooren, F.C., Voelker, K., Fobker, M., Lechtermann, A., Krueger, K., Fromme, A., Korsukewitz, C., Floel, A., et al. (2007). High impact running improves learning. *Neurobiol. Learn. Mem.* 87, 597–609.
- De Wit, J., Hong, W., Luo, L., and Ghosh, A. (2011). Role of Leucine-Rich Repeat Proteins in the Development and Function of Neural Circuits. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 697–729.
- Wu, C.W., Chang, Y.T., Yu, L., Chen, H.I., Jen, C.J., Wu, S.Y., Lo, C.P., and Kuo, Y.M. (2008). Exercise enhances the proliferation of neural stem cells and neurite growth and survival of neuronal progenitor cells in dentate gyrus of middle-aged mice. *J. Appl. Physiol* 105, 1585–1594.
- Xu, B., Gottschalk, W., Chow, A., Wilson, R.I., Schnell, E., Zang, K., Wang, D., Nicoll, R.A., Lu, B., and Reichardt, L.F. (2000). The role of brain-derived neurotrophic factor receptors in the mature hippocampus: modulation of long-term potentiation through a presynaptic mechanism involving TrkB. *J. Neurosci.* 20, 6888–6897.

- Yassa, M.A., Muftuler, L.T., and Stark, C.E.L. (2010). Ultrahigh-resolution microstructural diffusion tensor imaging reveals perforant path degradation in aged humans in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 12687–12691.
- Zhang, X., and Poo, M.M. (2002). Localized synaptic potentiation by BDNF requires local protein synthesis in the developing axon. *Neuron* *36*, 675–688.
- Zhao, C., Teng, E.M., Summers Jr., R.G., Ming, G.L., and Gage, F.H. (2006). Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J. Neurosci.* *26*, 3–11.
- Zhou, Q., and Poo, M.M. (2004). Reversal and consolidation of activity-induced synaptic modifications. *Trends Neurosci.* *27*, 378–383.
- Zito, K., Scheuss, V., Knott, G., Hill, T., and Svoboda, K. (2009). Rapid functional maturation of nascent dendritic spines. *Neuron* *61*, 247–258.
- Ziv, N.E., and Smith, S.J. (1996). Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron* *17*, 91–102.