

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

**DIFERENCIACIÓN NEURONAL EN EL CEREBRO ADULTO: POSIBLES
MECANISMOS DE REGULACIÓN**

por

Br. Andrés BENÍTEZ

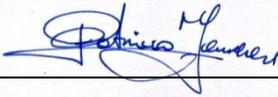
TESIS DE GRADO presentada como uno
de los requisitos para obtener el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias
Orientación: Higiene, Inspección control y
tecnología de los alimentos.

MODALIDAD: Ensayo Experimental

MONTEVIDEO
URUGUAY
2021

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:



Patricia Genovese

Segundo miembro (Tutor):



Aldo Calliari

Tercer miembro:



María E. Castelló

Fecha:

26/10/2021

Autor:



Andrés Benítez

AGRADECIMIENTOS:

En primer lugar deseo agradecer a mi tutor, el Dr. Aldo Calliari, por tantos años de trabajo y amistad.

Al área de Biofísica de la Facultad de Veterinaria, por el apoyo y tantos buenos momentos compartidos.

Al laboratorio de Patologías del metabolismo y envejecimiento del Institut Pasteur de Montevideo dirigido por Dr. Carlos Escande. Por abrirme las puertas, estando siempre dispuestos a brindarme todas las herramientas.

Al área de Patología de la Facultad de Veterinaria por siempre estar dispuestos a dar una mano, ofrecer sus conocimientos, además de permitir el uso de sus equipos. En especial al Dr. José Manuel Verdes y Lic. Victoria Yozzi

A todos los compañeros, compañeras, amigos y amigas que me han acompañado a lo largo de los años.

Finalmente, a mi familia, especialmente a mis abuelos por siempre darme el ejemplo.

TABLA DE CONTENIDOS:

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	5
RESUMEN.....	7
SUMMARY.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	11
HIPOTESIS.....	46
OBJETIVOS.....	47
MATERIALES Y METODOS.....	48
RESULTADOS.....	51
DISCUSIÓN.....	57
CONCLUSIONES.....	62
BIBLIOGRAFIA.....	63

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS:

	Página
Figura 1: Sistema nervioso central humano.....	12
Figura 2: Encéfalo con sus diferentes sectores según criterio ontogénico....	13
Figura 3: Telencéfalo mostrando división en los distintos lóbulos.....	15
Figura 4: Glías del sistema nervioso.....	16
Figura 5: Neurona motora con su correspondiente fibra.....	19
Figura 6: Sinapsis química y eléctrica.....	20
Figura 7: Corte coronal de cerebro de ratón señalando hipocampo y sus relaciones topográficas.....	22
Figura 8: Estructura del hipocampo murino.....	24
Figura 9: Hipocampo murino señalando su división en zonas.....	25
Figura 10: Diferenciación neuronal en nicho neurogénico del giro dentado.....	34
Figura 11: Gráfica de potencial de acción a largo plazo.....	41
Figura 12: DBC1 con sus diferentes segmentos representados.....	45
Figura 13: Inmunofluorescencia DBC1 en diferentes zonas del encéfalo.....	51
Figura 14: Estudio comparativo de DBC1 a diferentes edades.....	52
Figura 15: Inmunofluorescencia Ki67 en giros dentados de animales WT y KO para DBC1.....	54
Figura 16: Inmunohistoquímica DCX en giro dentado de un animal WT e Inmunofluorescencia DCX en giros dentados de animales WT y KO para DBC1.....	55
Figura 18: Expresión relativa de DCX en animales WT y KO para DBC1.....	56
Figura 19: Estudio morfológico de giros dentados de animales WT y KO para DBC1.....	58

Tabla 1: Cuantificación de la proporción de neuronas positivas a Ki67 en la zona subgranular del hipocampo de ratones WT y KO para DBC1.....54

RESUMEN:

Deleted in Breast Cancer 1 (DBC1) es una proteína ubicua cuya relevancia funcional ha permanecido prácticamente desconocida hasta hace pocos años, cuando emergió como un regulador relevante de SIRT1, una desacetilasa NAD dependiente. Esta última ha concitado gran interés debido a que en roedores se ha descrito que modula la ansiedad, participa en la consolidación de la memoria y es capaz de regular el comportamiento exploratorio. También es relevante debido a que se ha observado un efecto protector contra el desarrollo de diversas patologías neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson o Alzheimer. Por otra parte, animales KO para SIRT1 han mostrado pobres rendimientos en multiplicidad de tests que evalúan distintos tipos de memoria ya sea espacial, ejecutiva o asociativa, lo cual se asocia a un deterioro de las capacidades cognitivas, en particular aprendizaje espacial y memoria.

DBC1 es especialmente abundante en el hipocampo. Esta región es particularmente interesante debido a su rol en la consolidación de la memoria, proceso que depende de básicamente dos procesos: la plasticidad sináptica y la neurogénesis. Además, existen reportes recientes que asocian directamente la mutación de DBC1 en homocigosis con problemas congénitos del desarrollo del sistema nervioso y disfunciones cognitivas en seres humanos. Teniendo en cuenta estos aspectos propios a DBC1 y aquellos vinculados a SIRT1 (de la cual, al ser DBC1 su principal modulador negativo podría estar involucrada en mayor o menor medida) se sugiere que DBC1 desempeñe un rol relevante en la fisiología del sistema nervioso central vinculado a la neurogénesis, diferenciación neuronal o ambos procesos.

En el presente trabajo se logró determinar que existen variantes en la expresión de DBC1 de acuerdo con la edad, teniendo una curva de expresión coincidente con la actividad neurogénica a lo largo de la vida. Se observó que los animales adultos KO para DBC1 presentan una menor expresión de diferentes marcadores de proliferación celular y de diferenciación neuronal (Ki67 y doblecortina) a nivel del giro dentado del hipocampo. Finalmente, se logró encontrar alteraciones a nivel morfológico en el giro dentado del hipocampo, caracterizado por una menor dimensión en el eje longitudinal antero-posterior. En su conjunto, estos datos sugieren que DBC1 cumpliría un rol relevante como mecanismo de regulación de la neurogénesis y/o diferenciación neuronal en el cerebro adulto

SUMMARY:

Deleted in Breast Cancer 1 (DBC1) is an ubiquitous protein whose functional relevance has remained virtually unknown until a few years ago, when it emerged as a relevant regulator of SIRT1, a NAD-dependent deacetylase. The latter has attracted great interest because in rodents it has been described that it modulates anxiety, participates during memory consolidation and in regulating exploratory behavior. It is also important because a positive effect has been observed as a protector against the development of various neurodegenerative pathologies such as Parkinson's or Alzheimer's disease. On the other hand, KO animals for SIRT1 have shown poor performance in multiplicity of tests that evaluate different types of memory, whether spatial, executive or associative, which is associated with a deterioration in cognitive abilities, spatial learning and memory.

DBC1 is especially abundant in the hippocampus. This region is particularly interesting due to its role in memory consolidation, a process that depends on basically two processes: synaptic plasticity and neurogenesis. Furthermore, there are recent reports that directly associate the homozygous DBC1 mutation with congenital problems of the development of the nervous system and cognitive dysfunctions in humans. Taking into account these aspects of DBC1 and those related to SIRT1, of which, being its main negative modulator, it could be involved to a greater or lesser extent, it is suggested that DBC1 plays a relevant role in the physiology of the central nervous system linked to neurogenesis, neuronal differentiation or both processes.

In the present study, it was possible to determine that there are variants in the expression of DBC1 according to age, having an expression curve coincident with the neurogenic activity throughout life. On the other hand, it was observed that the KO animals for DBC1 present a lower expression of different markers of neurogenesis and / or neuronal differentiation (Ki67 and doublecortin) at the level of the dentate gyrus of the hippocampus. Finally, it was possible to find alterations at the morphological level in the dentate gyrus of the hippocampus, presenting a smaller dimension in the anteroposterior longitudinal axis, suggesting that DBC1 work as a mechanism for regulating neurogenesis and neuronal differentiation in the adult brain

INTRODUCCION:

Se denomina neurogénesis al proceso por el cual se generan nuevas neuronas a partir de células madre y/o células progenitoras (Altman y Das, 1965).

La neurogénesis ocurre durante la embriogénesis de todos los animales y es responsable de producir todas las neuronas del organismo. Antes que se produzca la neurogénesis, las células madre neurales se multiplican hasta alcanzar el número correcto de células progenitoras. El proceso de neurogénesis requiere una división celular asimétrica de la célula madre neural progenitora que producirá neuronas hijas que no se dividirán de nuevo. Si bien la neurogénesis se encuentra más activa durante el desarrollo prenatal, se ha demostrado que continúan existiendo dos zonas del cerebro adulto de mamíferos con precursores neuronales que eventualmente pueden desarrollar el proceso de neurogénesis: la zona subgranular del giro dentado del hipocampo (Altman, 1969) y la zona subventricular de los ventrículos laterales (Fabel y Kempermann, 2008). Teniendo la particularidad que los precursores neuronales presentes en la zona subventricular de los ventrículos laterales dan origen a neuroblastos que migran hacia el bulbo olfatorio donde terminan de desarrollarse. A este proceso se le conoce como neurogénesis adulta.

Por otro lado, la proteína DBC1 ha sido descrita en forma relativamente reciente, no teniendo adjudicadas funciones claras aún (Kim, Chen y Lou, 2008; Zhao, Kruse et al., 2008). En un principio fue propuesta como ausente en algunos tipos de cáncer de mama (Hamaguchi et al., 2002), sin embargo hasta el día de hoy no hay evidencia de que esté relacionada de alguna forma con la tumorigénesis. Actualmente DBC1 se propone como un regulador metabólico en el hígado, el tejido adiposo y también involucrado en la apoptosis (Chini, Chini, Nin y Escande, 2013). A nivel molecular, se ha propuesto que DBC1 es capaz de regular la actividad de una desacetilasa dependiente de NAD conocida como SIRT1 (Escande et al., 2010). Esta proteína despertó gran interés en los últimos años debido a que su activación está directamente relacionada a la menor prevalencia de enfermedades crónicas de base inflamatoria (diabetes, obesidad, etc.), cáncer y como consecuencia mayor longevidad (Libert et al., 2011). SIRT1 también ha sido asociada a funciones en el sistema nervioso central, tales como la modulación de la ansiedad, la memoria, el aprendizaje y la protección contra enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Corpas et al., 2016). La función de DBC1 en el sistema nervioso central es presumiblemente relevante ya que esta proteína se encuentra sumamente expresada en el cerebro y en particular en el giro dentado del hipocampo adulto, aunque no todas las neuronas del mismo la parecen expresar de la misma forma (Varela, 2016). Por otro lado, en el sistema nervioso periférico (SNP) se ha determinado que DBC1 produce

protección contra la degeneración Walleriana; al DBC1 ser capaz de regular la actividad de SIRT1, ambas proteínas podrían tener un rol relevante en la fisiología del SNP (Calliari, Bobba, Escande y Chini, 2014).

La expresión de DBC1 está fuertemente asociada al ciclo celular y su ausencia interfiere con esta función. Utilizando cultivos celulares primarios o de líneas no tumorales (MEFs, NIH-3t3, IMR90), se ha observado una modificación post traduccional caracterizada por proteólisis regulada del extremo amino de DBC1; Cuando las células se encuentran mayormente quiescentes ya sea por confluencia o por privación de suero en el medio de cultivo, predomina la forma clivada. Durante la proliferación activa, predomina la forma completa de la proteína (Santos et al., 2019; Colman et al., 2020). El mapeo del sitio de corte sugiere que como consecuencia, DBC1 pierde su capacidad de regular algunas de sus proteínas dianas, particularmente interesante resulta que deja de unir y regular SIRT1 (Santos et al., 2019).

En base a lo anterior surgen diversas interrogantes, entre las cuales saber si DBC1 es capaz de regular la actividad neurogénica en el giro dentado del hipocampo, es el motivo del presente trabajo. Nuestra hipótesis de trabajo es que sí lo hace, por lo que intentaremos demostrar que: a) La expresión local de DBC1 varía según la edad (vinculado a los momentos de mayor o menor neurogénesis); b) que la neurogénesis y/o la diferenciación neuronal se verá afectada en los animales KO para DBC1; c) lo anterior generará a su vez, alteraciones estructurales del giro dentado.

REVISIÓN BIBLIOGRAFICA:

Aspectos relevantes de la estructura y función del Sistema Nervioso:

El sistema nervioso es una compleja red de células que interactúan entre ellas y con el entorno permitiendo al organismo relacionarse con el ambiente y regular su medio interno (Ludwing, Reddy y Varacallo, 2017). En los organismos más sencillos la célula receptora y la efectora están comunicadas directamente (Pantin, 1956), pero en los animales superiores en la mayoría de los casos la célula receptora se encuentra a distancia de la efectora comunicándose a través de una serie de interneuronas (Mackie, 1990). Para cumplir sus funciones, además de las células gliales, el sistema nervioso cuenta con tres grandes tipos neuronales: las sensoriales, las motoras y las interneuronas. Estas últimas se encargan de formar un sistema complejo de interacciones que permiten el correcto funcionamiento y coordinación entre lo sensorial y lo motor (Kepecs y Fishell, 2014). Las sensoriales se encargan de la detección, reconocimiento y procesamiento de los diferentes tipos de estímulos, mientras que las motoras se encargan de proveer el control de los diferentes tipos de tejidos musculares, ya sea esquelético, cardíaco o liso, así como también controlar la secreción glandular (Purves et al., 2008). Cualquier cambio en el ambiente producirá un estímulo, dicho estímulo será reconocido por un receptor que desencadenará una serie de eventos que culminarán con una respuesta acorde.

Existen diversas formas de subdividir al sistema nervioso pero probablemente la principal y más clásica es en sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP). En los mamíferos, el SNC está conformado por el encéfalo y la médula espinal (figura 1). Ambos componentes se encuentran recubiertos por tres membranas de tejido conjuntivo (duramadre, aracnoides y piamadre) llamadas colectivamente meninges, entre las cuales discurre líquido cefalorraquídeo con función de protección y amortiguación del encéfalo o la médula espinal (Greenberg, Lane, Cinnamon, Farmer y Hyman, 1994). Exteriormente, el SNC se encuentra protegido por estructuras óseas como son el cráneo y el canal medular (Konig y Liebich, 2005).

Las funciones sensoriales del SNC tienen como participante indispensable a todos los nervios sensoriales que se encuentran en los diferentes tejidos del organismo. Existen diferentes tipos de sensibilidades si bien todas tienen en común percibir estímulos y procesarlos para dar una respuesta acorde. La sensibilidad puede ser propioceptiva en donde lo que se percibe es la posición del cuerpo, exteroceptiva cuando la información que se percibe proviene del mundo

exterior (ejemplo: estímulos captados por los órganos de los sentidos) o vegetativa/visceral cuando los estímulos vienen desde vísceras o vasos sanguíneos. Es a partir de la recepción y procesamiento de parte de la información sensorial que un individuo, independientemente de la especie, haciendo uso de procesos cognitivos más complejos como la memoria y el aprendizaje puede evaluar su entorno, adaptarse a él y eventualmente predecir cambios en el mismo.

Por su parte, las funciones motoras consisten resumidamente en coordinar distintas secuencias de movimientos que surgen como respuesta a previos estímulos sensoriales. Se pueden clasificar en motricidad somática cuando se habla de procesos que involucran movimiento de tejido muscular estriado pudiendo en general ser regulado de forma voluntaria por el individuo. Por otro lado también se puede distinguir a la motricidad visceral en referencia al tejido muscular liso siendo éste incapaz de ser regulado por la voluntad.

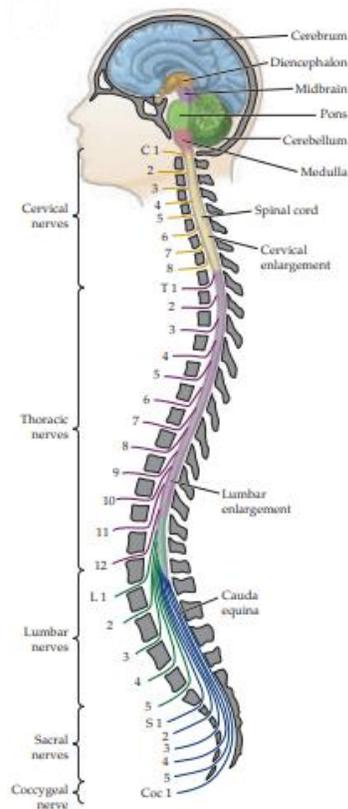


Fig.1: Representación esquemática de un sistema nervioso central humano, especificando sus componentes principales. Imagen tomada de Purves et al., 2008.

El encéfalo es considerado como el órgano superior de integración, coordinación y regulación de la actividad nerviosa a todo nivel. Por definición,

constituye la masa nerviosa delimitada por el cráneo e incluye el cerebro, el cerebelo y el tronco encefálico (figura 2). Por otro lado, se lo puede clasificar según criterios vinculados a la ontogénesis y filogénesis. Durante el desarrollo fetal se van formando de la siguiente forma, dos grandes estructuras denominadas rombencéfalo y prosencéfalo. Dentro del rombencéfalo se puede subdividir en: mielencéfalo, metencéfalo, mesencéfalo. Mientras que el prosencéfalo se subdivide en: diencefalo y telencéfalo.

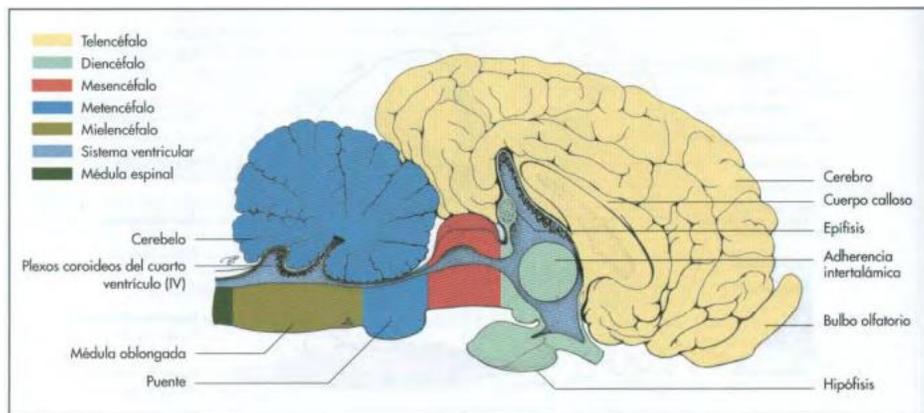


Fig. 2: Representación esquemática del encéfalo equino mostrando las distintas porciones. Explicación en el texto. Imagen tomada de König y Liebich 2005.

El telencéfalo, también conocido como cerebro, es el más relevante a los efectos de esta tesis. El mismo está dividido en dos hemisferios, izquierdo y derecho. Ambos hemisferios se encuentran comunicados entre sí mediante el cuerpo caloso, una estructura conformada básicamente por el entrecruzamiento de fibras nerviosas provenientes de ambos lados. La superficie del cerebro presenta circunvoluciones y surcos que cumplen la función básica de aumentar su área. Clásicamente los anatomistas las han usado como referencias anatómicas o límites más o menos arbitrarios para describir distintas zonas de interés. Una de las fisuras más relevantes es la que delimita ambos hemisferios, llamada fisura longitudinal. Típicamente, cada hemisferio es subdividido en lóbulos en base a accidentes topográficos; de esta forma es que se definen los 4 lóbulos cerebrales: lóbulo frontal, lóbulo parietal, lóbulo temporal y lóbulo occipital. Si bien esta división es útil para desarrollar conceptos funcionales de forma más sencilla y localizada, el criterio es básicamente topográfico ya que dentro de cada uno de ellos se encuentran distintas zonas con particularidades histológicas y funcionales determinadas que en muchas ocasiones exceden sus límites. De hecho, el nivel de intercomunicación entre los mismos es tal que ninguno de ellos actúa de forma independiente, sino que son parte de un único órgano que los involucra a todos.

El lóbulo frontal, como su nombre indica, se encuentra en las regiones anteriores del cerebro estando delimitado a posterior por la cisura de Rolando y a ventral por la cisura de Silvio (Stuss y Knight, 2013). Las funciones en las que se encuentra implicado se pueden resumir en: ser el origen de los movimientos de las extremidades debido a su gran proporción de áreas motoras que dan origen a las vías piramidales (Hoffmann, 2013); por otro lado se lo puede vincular a los distintos comportamientos sociales y sexuales (Baird, Wilson, Bladin, Saling y Reutens, 2007); también se encuentra asociado, particularmente en animales superiores, a razonamientos y elaboración de estrategias para la resolución de problemas (Collins y Koechlin, 2012). El lóbulo parietal se encuentra a posterior del lóbulo frontal proyectándose desde la cisura de Rolando, a dorsal de la cisura de Silvio hasta la cisura occipital. Allí se encuentra la mayor parte de las cortezas sensoriales responsables de procesar la información proveniente de la piel vinculados a la temperatura, dolor y tacto en general (Sathian, 2016); también se asocia a la toma de decisiones y conciencia espacial. Continuando, podemos describir al lóbulo occipital que se encuentra en toda la zona a posterior de la cisura occipital. Su función principal está asociada a la recepción y procesamiento de la información visual, pues allí se ubica la corteza visual primaria cuya aferencia principal es la información proveniente del campo visual (Kanwisher, McDermott y Chun, 1997). Por último, el lóbulo temporal se localiza a ventral de la cisura de Silvio desde el extremo frontal hasta la cisura occipital. Allí está contenida la corteza entorrinal y la formación hipocampal, ambas relacionadas con la recepción y el procesamiento de la información proveniente de los estímulos medioambientales y también interna (Kaas y Hackett, 1999); también asociada a la formación de memorias (Scoville y Milner, 1957). Por último, más ventralmente se localiza la amígdala, responsable de las vías asociadas al procesamiento de reacciones vinculadas con la respuesta de ansiedad, furia o placer (Kiernan, 2012).

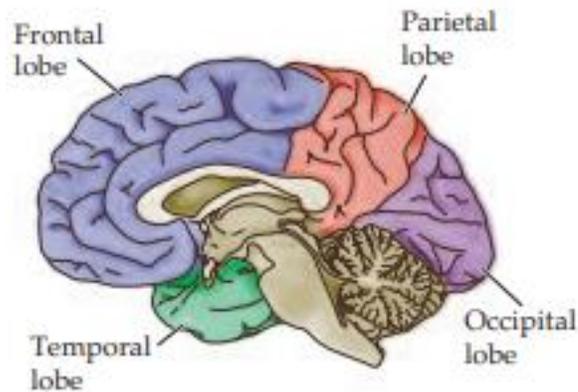


Fig. 3: Representación gráfica de un telencéfalo tipo, regiones coloreadas mostrando la subdivisión en lóbulos cerebrales. Explicación en el texto. Imagen tomada de Purves et al., 2008.

Células características del Sistema Nervioso: glías y neuronas

Las células neurogliales, células gliales o simplemente glía son diferentes formas de nombrar a células cuya principal particularidad es que no participan directamente en las sinapsis y/o la señalización eléctrica, sino brindan funciones tróficas y de apoyo a las neuronas para realizar una correcta sinapsis. En proporción, las células gliales se encuentran superando a las neuronas en número por tres (Purves et al., 2008). Al igual que las neuronas, tienen origen ectodérmico y su diferenciación en los correspondientes linajes es temprana durante el desarrollo embrionario.

La palabra glía, es original del griego y significa “pegamento”, esto refleja la presunción del siglo XIX de que estas células mantenían unido el sistema nervioso de alguna manera. La palabra se mantiene a pesar de que no se ha podido demostrar que unir las células nerviosas sea una de sus funciones. Las funciones gliales que están bien establecidas incluyen el formar la mielina que recubre los axones y contribuir así a mantener el medio iónico de las células nerviosas y modular la velocidad de propagación de la señal nerviosa, actuar como soporte trófico para las neuronas, modular la acción sináptica controlando la captación de neurotransmisores en o cerca de la hendidura sináptica y ayudar a la recuperación de una lesión neural (Kettenmann y Ransom, 2005). Hay dos tipos principales de células gliales en el sistema nervioso central: astrocitos y oligodendrocitos.

Los astrocitos se ubican exclusivamente en el cerebro y la médula espinal, tienen prolongaciones múltiples que dan a estas células una apariencia de estrella (figura 4A). Una función importante de los astrocitos es mantener, de diversas formas, un entorno químico apropiado para la señalización neuronal (Kettenmann y Ransom, 2005).

Los oligodendrocitos tienen como principal función la formación de la mielina de los axones. La mielina está constituida principalmente por la membrana plasmática y pequeñas cantidades de citoplasma del oligodendrocito que rodea y envuelve en sucesivas capas el axón neuronal siendo una prolongación del oligodendrocito (figura 4B). Por esta razón es de naturaleza aislante de la corriente iónica y por eso genera profundos efectos sobre la excitabilidad neuronal y la velocidad de transmisión de señales eléctricas por los axones. En el sistema nervioso periférico, las células que elaboran la mielina se denominan células de Schwann (Noble, Murray, Stroobant, Waterfield y Riddle, 1988).

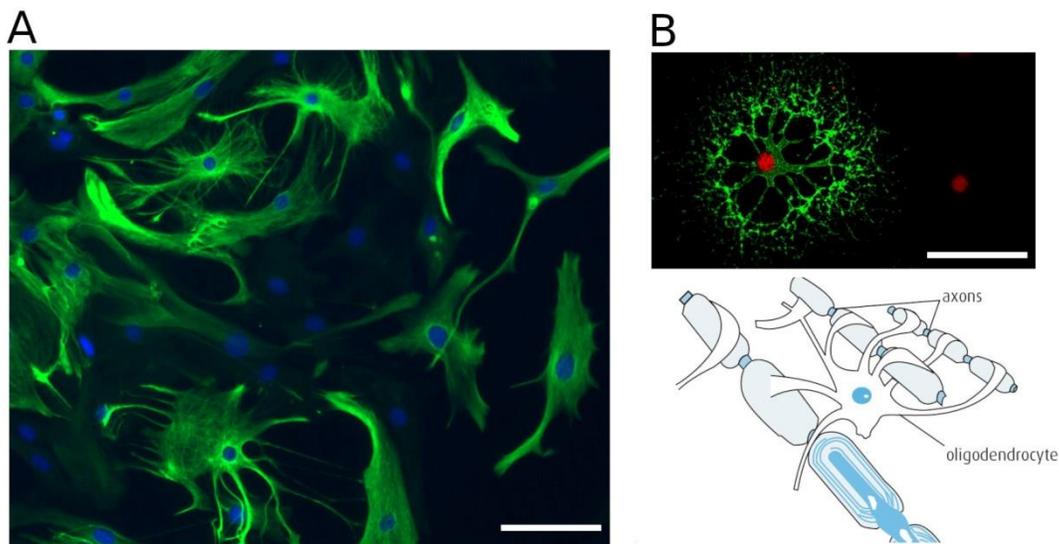


Figura 4. Glías del Sistema Nervioso. A; Astrocitos cultivados in vitro recrean en gran medida la morfología que poseen en el tejido. Nótese la disposición expandida y estrellada de su citoplasma evidenciado por la presencia de la proteína glial fibrilar ácida (GFAP) marcada en verde. En azul, se marca el ADN nuclear. © Lonza Laboratories, Basel, Switzerland.; B (arriba); Oligodendrocito creciendo in vitro con su citoplasma explayado y expresando la proteína básica de la mielina (MBP), en verde. Su morfología in vitro es muy diferente a la observada in vivo (abajo), donde su citoplasma forma la mielina en más de un axón simultáneamente. Barra 50micras. Imagen tomada de Ding et al., 2020

Las neuronas y las células gliales comparten los mismos organelos con todas las células. En las neuronas, sin embargo, estos organelos se distribuyen de

forma diferente según las distintas regiones de la célula. Además de la distribución de organelos, las neuronas y las células gliales son diferentes entre sí y al mismo tiempo diferentes de otras células en los genes que expresan. Esto es muy evidente, por ejemplo en las proteínas que constituyen el citoesqueleto. Además, aunque muchas de estas proteínas, tales como actina, tubulina y miosina se encuentran en otras células, su organización particular en las neuronas es fundamental para la función de los procesos neuronales y las uniones sinápticas. Por ejemplo, los microtúbulos de las neuronas dirigen el crecimiento de axones y dendritas además de regular los procesos activos de exocitosis y endocitosis vinculados a la comunicación sináptica.

En una neurona se pueden distinguir tres grandes territorios diferenciados estructural, funcional y bioquímicamente: soma, axón y dendritas (figura 5). El soma es la región de la neurona que contiene el núcleo celular. El soma de una neurona contiene múltiples organelos, particularmente cuenta con la presencia de los llamados gránulos de Nissl, que se componen principalmente de retículo endoplásmico rugoso y polirribosomas libres (Major y Tank, 2004). Existen dos características principales del soma: ser el lugar donde se originan tanto las dendritas como el axón; por otra parte, es a nivel del soma (en conjunto con las regiones postsinápticas dendríticas y el resto del árbol dendrítico) donde ocurre la integración de diversas señales provenientes de sinapsis inhibitorias o excitatorias que pueden regular la actividad celular. Particularmente, es en el soma donde se da la integración de señales del tipo eléctrico.

Las dendritas son proyecciones múltiples y cortas que en general se inician en el soma neuronal (Ramon y Cajal, 1933) siendo la principal entrada de las señales sinápticas desde otras neuronas (Baer y Rinzel, 1991). Las neuronas tienen una cantidad muy variable de dendritas, pueden tener desde una pequeña cantidad o incluso algunas carecer por completo de ellas como por ejemplo las células neurosecretoras, las neuronas pseudounipolares, las unipolares de invertebrados o las bipolares de la retina de vertebrados, hasta neuronas con arborizaciones dendríticas muy complejas (Cherniak, Changizi y Kang, 1999). Un caso paradigmático de este último tipo neuronal son las células de Purkinje del cerebelo. El número de entradas que recibe una neurona particular depende de la complejidad de su eje dendrítico y de hecho, las células nerviosas que carecen de dendritas son inervadas por solo una o unas pocas células nerviosas; aquellas con un árbol dendrítico más elaborado, son inervadas por un número mayor de otras neuronas (Cherniak et al., 1999). Las espinas dendríticas del hipocampo muestran la particularidad de tener importante plasticidad estructural y funcional, dicha plasticidad actúa como base de los cambios fisiológicos que subyacen al aprendizaje y la memoria. La estructura de las dendritas está regulada por

mecanismos moleculares y pueden cambiar su morfología de acuerdo al nivel de la actividad sináptica. Las dendritas cuentan con un citoesqueleto compuesto, entre otras, por actina monomérica (G-actina) y filamentosa (F-actina) presentes en las espinas en sus regiones más alejadas. Mientras que en regiones más proximales al soma consisten principalmente en una red de actina F (Hotulainen y Hoogenraad, 2010). La composición en las regiones más externas (espinas) parece ser dinámica vinculándola a mecanismos que alteran la morfología dendrítica mientras que en las regiones más próximas al soma se encuentran poblaciones más estables con funciones de dar soporte a la estructura (Honkura, Matsuzaki, Noguchi, Ellis-Davis y Kasai, 2008). Fisiológicamente una de las funciones más relevantes del citoesqueleto de actina en las espinas dendríticas maduras es modular la estructura de la misma en respuesta a la señalización postsináptica (Star, Kwiatkowski y Murthy, 2002). Además, contribuye a la estructura general de las sinapsis (Sheng y Hoogenraad, 2007), estabilizando los receptores postsinápticos y localizando la maquinaria de traducción (Hotulainen y Hoogenraad, 2010).

El axón es una extensión única del soma neuronal que varía en su longitud según el tipo de neurona y el tamaño de la especie (Ramon y Cajal, 1933). Existen neuronas con axones muy cortos e incluso algunas no tienen axones en absoluto, mientras que los axones de algunas neuronas se extienden a objetivos muy distantes (Stuart, Spruston, Sakman y Häusser, 1997). Los axones relativamente cortos son una característica de las neuronas o interneuronas de circuitos locales en todo el cerebro pero por lo contrario los axones de gran longitud se relacionan con neuronas de proyección (Segev y Schneidman, 1999). Un ejemplo típico son las motoneuronas del asta ventral de la medula, cuyos axones pueden superar el metro de longitud en animales de gran talla. Una característica distintiva axonal es el evento eléctrico mediante el cual, se transportan señales a través del axón y que se denomina potencial de acción; se trata de una onda de actividad eléctrica que se propaga desde su punto de iniciación en el llamado cono de arranque del axón (figura 5), hasta la terminal axonal donde esa señal eléctrica se transformará en señal química (Debanne, 2004). En efecto, el proceso que permite a una neurona transmitir su señal a otra célula excitable (neurona o miocito), se llama sinapsis. Este mecanismo puede ser eléctrico o químico (Elias y Saucier, 2006). De acuerdo a esto, las sinapsis se clasifican en sinapsis químicas y sinapsis eléctricas.

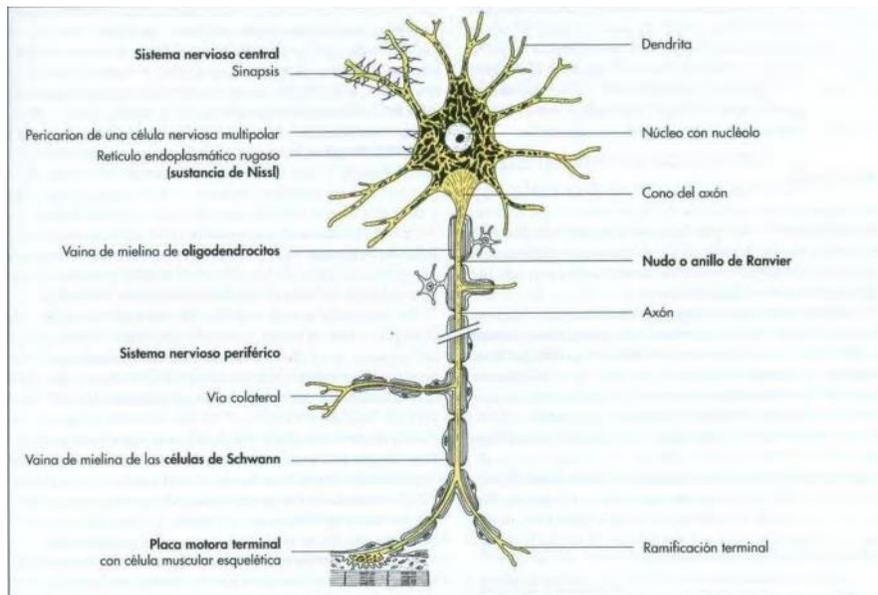


Fig. 5: Representación de una neurona motora y fibra nerviosa periférica con placa motora terminal en célula de músculo esquelético. Imagen tomada de Konig y Liebich 2005.

Las sinapsis eléctricas son la minoría de las sinapsis que se dan en el sistema nervioso de los mamíferos, pero son muy comunes en peces y vertebrados anamniotas. Estas poseen importantes diferencias estructurales y funcionales con respecto a las sinapsis químicas (Kandel, Schwartz y Jessel, 2000). En las eléctricas el medio intracelular de las neuronas pre y post sináptica están conectados por medio de estructuras proteicas macromoleculares que forman canales transmembrana denominadas conexones. Estas estructuras permiten que el potencial eléctrico entre neuronas sea transportado notoriamente más rápido que en las sinapsis químicas (Bennet y Zukin, 2004). A nivel de los conexones no se verifica el conocido retardo sináptico, que sí ocurre en las sinapsis químicas debido al tiempo de liberación y difusión del neurotransmisor y su recepción en el elemento postsináptico y la cascada de señalización postsináptica. Por otra parte, los conexones también permiten el intercambio bidireccional de moléculas tales como ATP y otros segundos mensajeros, condición inexistente en las sinapsis químicas (Bennet, Aljure, Nakajima y Pappas, 1963).

Por su parte, en la sinapsis química la comunicación se da a través de sustancias químicas liberadas por el componente presináptico conocidas como neurotransmisores (Katz, 1967). El proceso que ocurre durante la sinapsis química

comienza con un potencial de acción que viaja a lo largo de un axón (Hodgkin y Huxley, 1952). Este potencial de acción es generado debido al transporte a través de la membrana celular de iones de sodio que pasan desde el ambiente extracelular al interior citoplasmático, seguidos de un desplazamiento de iones de potasio en el sentido inverso (Hodgkin y Huxley, 1952). Cuando estos potenciales de acción alcanzan el terminal sináptico, estimulan la apertura de canales de calcio y dicho calcio a su vez producirá la liberación de los neurotransmisores correspondientes que se encuentran dentro de las vesículas sinápticas (Katz, 1967). El proceso de liberación mencionado ocurre por exocitosis, permitiendo la liberación del neurotransmisor a la hendidura sináptica donde difunde a través de este espacio llegando hasta el componente post sináptico. Una vez arribado al elemento postsináptico y dependiendo de su naturaleza química y del tipo de receptores presentes en el elemento post sináptico, el neurotransmisor puede generar un efecto excitatorio o inhibitorio sobre la neurona pos sináptica. Por último, luego de producido el efecto es necesario eliminar el neurotransmisor para evitar que continúe su acción mediante tres posibles mecanismos: degradación enzimática, recaptación y difusión a través del espacio intercelular (Vandenbranden et al., 1996).

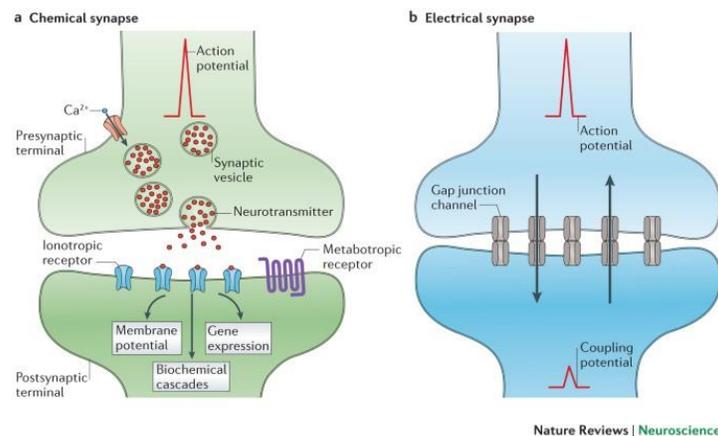


Figura 6. Sinapsis eléctricas y químicas. Izquierda; sinapsis química caracterizada por la comunicación intercelular en base a la exocitosis de neurotransmisores que se liberan a la hendidura sináptica y terminan impactando sobre receptores post sinápticos. El estímulo de estos receptores puede generar varias consecuencias, entre ellas y como se indica, regenerar el potencial de acción. Derecha; sinapsis eléctrica. Allí, el flujo de iones producto del potencial de acción, pasa directamente a la célula post sináptica a través de canales iónicos comunes a ambas membranas (conexones). Las flechas indican la dirección de la corriente. Nótese que las sinapsis eléctricas pueden ser bidireccionales. Imagen tomada de Pereda, A., 2014.

Funcionalmente las sinapsis químicas se pueden subdividir en dos tipos según el efecto que produzcan: sinapsis excitadoras y sinapsis inhibitoras. Las sinapsis excitadoras o excitatorias son aquellas en las cuales los neurotransmisores implicados provocan una despolarización local en la membrana de la célula postsináptica facilitando la generación posterior de impulsos eléctricos denominados potenciales de acción; esto ocurre debido a que el neurotransmisor excitatorio estimula el ingreso del ion sodio en el elemento postsináptico (Favuzzi y Rico, 2018). En estos casos, el sodio puede ingresar por dos mecanismos: a partir de receptores inotrópicos en donde el neurotransmisor estimula su apertura; o a partir de canales metabotrópicos en donde el neurotransmisor estimula la producción de un segundo mensajero el cual será responsable de la apertura de los canales de sodio (Kirischuk, Kettenmann y Verkhratsky, 2007). Por otra parte, las sinapsis inhibitoras o inhibitorias son aquellas en donde el neurotransmisor genera una hiperpolarización del potencial de membrana alejándolo del valor umbral de despolarización. Para generar esto lo que ocurre es el ingreso del ion cloro a la post sinapsis a través de canales específicos que se abren en respuesta al neurotransmisor liberado en las vesículas sinápticas (Favuzzi y Rico, 2018).

El circuito hipocampo-entorrinal. Procesamiento primario de la información aferente:

El hipocampo es una región bilateral y relativamente grande presente en el lóbulo temporal del cerebro, estando compuesta por diversas subregiones con características propias en lo morfológico y en lo funcional: el Cornu ammonis y el giro dentado, estando ambas partes separadas por la que podríamos considerar la tercera, el subículo del hipocampo. Algunos anatomistas también lo dividen en hipocampo propiamente dicho (referido al Cornu ammonis, CA), el giro dentado (DG), el subículo y la corteza entorrinal (CE). Sin importar la forma en la que se prefiera clasificarlo, cuando se quiere hacer mención a todo el conjunto se le denomina Formación hipocampal. Clásicamente según la histología, el Cornu ammonis se divide en CA1, CA2 y CA3. CA2 es un área pequeña, sin límites claros ni un patrón histológico propio, por lo que incluso la mayoría de los anatomistas e investigadores actuales ni siquiera la consideran en sus divisiones (Tzakis y Holahan, 2019). Justo enfrente de CA1, se encuentra el subículo que conecta el hipocampo con la corteza entorrinal (figura 7).

En lo funcional, el hipocampo se ve asociado principalmente con la memoria y el comportamiento (Bartsch, Dörhing, Rohr, Jansen y Deuschel, 2011). Los primeros estudios ya demostraban que los animales con lesiones en su hipocampo desarrollaban amnesia y la imposibilidad para generar nuevos

recuerdos (Scoville y Milner, 1957); más recientemente se ha demostrado que este tipo de lesiones impactan en la habilidad de los roedores para aprender (Phillips y LeDoux, 1992) y en la memoria espacial (Morris, Garrud, Rawlins y O'Keefe, 1982). Relacionado al comportamiento se ha demostrado que el hipocampo tiene un rol clave en la regulación relacionada al "humor" y comparte un circuito de señalización con la amígdala, que es el núcleo nervioso primariamente relacionado con lo emotivo. Estudios en humanos han podido demostrar que pacientes con historiales depresivos presentan alteraciones en su hipocampo (Sheline, Wang, Gado, Csernansky y Vannier, 1996) y que los tratamientos con antidepresivos también logran modificarlo (Frodl et al., 2008).

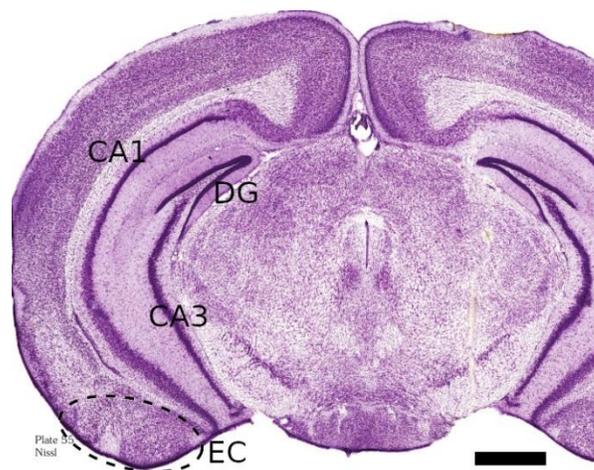


Figura 7: Corte coronal de cerebro murino teñido con Nissl, donde se aprecia la relación topográfica de los diferentes elementos del hipocampo (CA1, CA3 y DG) en relación a la corteza entorrinal (EC), delimitada por línea de trazos. Barra:1mm Imagen tomada de Franklin y Paxinos, 2008.

Existe un circuito interno al propio hipocampo que comunica sus diferentes sectores entre sí y con las regiones más directamente involucradas en su función:

a) Corteza entorrinal: Esta región conecta e integra información sensorial aferente primaria proveniente de diferentes regiones de la neocorteza. Se considera que procesa información básicamente relacionada a la formación de memoria, la navegación y la percepción del tiempo. Es considerada la principal interface entre el resto de la corteza y el hipocampo. Se ha observado que la entrada de la corteza entorrinal al giro dentado a través de la vía perforante (figura 8), juega un papel importante en el reconocimiento de patrones y la codificación de recuerdos (Witter, Gronewegen, Lopes Da Silva y Lohman, 1989).

b) Vía perforante: los axones presentes en la vía perforante surgen en las capas II y III de la corteza entorrinal con poca contribución de las capas más profundas IV y V. Los axones de las capas II y IV se proyectan a las células granulares del giro dentado y piramidales de CA3, mientras que las de las capas III y IV se proyectan a células piramidales de CA1 (Van Hoesen y Pandya, 1975). Es importante destacar que la recuperación de información se logra mediante la entrada de la corteza entorrinal a CA3 a través de la capa III de la vía perforante (Murray y Mishkin, 1983). Una vía distinta también va desde la corteza entorrinal a través de la capa III de la vía perforante hasta las neuronas CA1 (Van Hoesen y Pandya, 1975). Las células piramidales de CA1 envían sus axones al subículo y capas profundas de la corteza entorrinal mientras que las neuronas subiculares envían sus axones principalmente a la corteza entorrinal (Soltesz y Losonczy, 2018).

c) Colaterales de Schaffer: son ramas colaterales de axones emitidos por las células CA3 del hipocampo y se proyectan a la región CA1 (Schaffer, 1892). Estas estructuras cumplen un papel importante en la formación de la memoria y por otra parte, la conducción en estos circuitos es excitadora estando implicadas en la plasticidad neuronal (Tsien, Huerta y Tonegawa, 1996).

d) La región Baso-lateral de la amígdala y el hipocampo exhiben actividad eléctrica conjunta durante el desarrollo de comportamientos relacionados a los estados de ansiedad. De hecho la actividad a nivel de amígdala afecta la plasticidad y funcionalidad del hipocampo. A propósito, mediante el uso de trazadores retrógrados, se ha descrito una vía monosináptica que une el núcleo basolateral con CA1, la mayor vía eferente hipocampal (Yang y Wang, 2017).

e) El otro componente del hipocampo es el Giro Dentado, se trata de una región de la formación hipocampal que se encuentra separada anatómicamente del cornu ammonis. Por su particular importancia se desarrollará más en detalle a continuación.

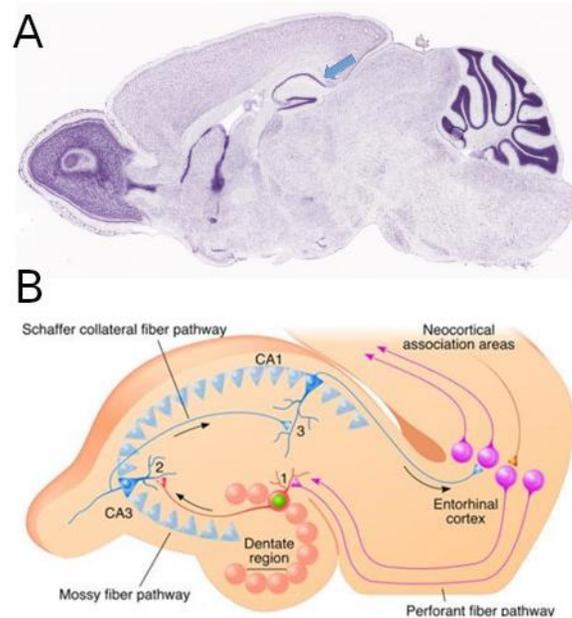


Fig. 8: Estructura del hipocampo. A; corte sagital de un cerebro murino donde se observa la región hipocámpal (flecha) en el contexto de todo el encéfalo; Allen, 2008. B; Representación del eje hipocampo-corteza entorrinal, mostrando sus diferentes zonas y vías de comunicación entre ellas o con otras zonas cerebrales. Imagen tomada de Araujo-Casagrande, M., 2017

Aspectos estructurales y funcionales relevantes del Giro dentado:

El giro dentado entendido como un todo tiene una estructura relativamente similar a lo largo del eje antero-posterior del hipocampo y generalmente no se divide en subregiones. Sin embargo, en cortes frontales tiende a tener más forma de “V” en los sectores anteriores y más forma de “U” posteriormente a medida que va posicionándose cada vez más ventral. El giro dentado se puede dividir en tres capas: molecular, granular y polimórfica. La primera de ellas desde el exterior al interior, es una capa relativamente libre de células llamada capa molecular que está ocupada principalmente por las dendritas de las células granulares dentadas que componen la capa celular inmediatamente debajo de la molecular. Las otras estructuras principales de la capa molecular son las fibras de la vía perforante que se originan en la corteza entorrinal y fibras de una variedad de entradas extrínsecas que terminan allí (Förster, Zhao y Frotscher, 2006). También hay una pequeña cantidad de interneuronas que residen en la capa molecular. Un grupo de ellas se localizan en lo profundo de la capa molecular, tienen un cuerpo celular triangular y da lugar a un axón que llega hasta la capa molecular. Este tipos de

neuronas tiene unas dendritas espinosas que permanecen principalmente dentro de la capa molecular y se han denominado células MOPP por sus siglas en inglés, célula asociada a la ruta perforante de la capa molecular (Li et al., 2013). Se ha descrito un segundo tipo de neurona en la capa molecular que se denomina célula axoaxónica (Soriano y Frotscher, 1989). Estas células generalmente se encuentran inmediatamente adyacentes o incluso dentro de la porción superficial de la capa de células granulares. La célula axoaxónica recibe su nombre por el hecho de que su axón desciende de la capa molecular a la capa de células granulares y luego termina en los segmentos iniciales del axón de las células granulares. Dado que estas células son positivas para los marcadores de neuronas GABAérgicas es probable que proporcionen un medio adicional de control inhibitorio para las células granulares (Soriano y Frotscher, 1989).

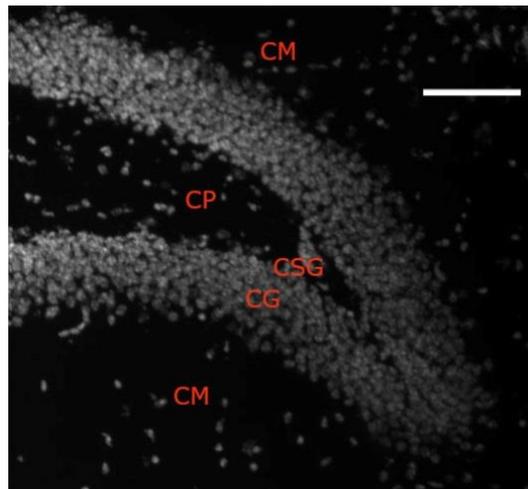


Fig.9: Giro dentado de hipocampo murino señalando su división en zonas. CP: Capa polimórfica. CM: Capa molecular. CG: Capa granular. CSG: Capa subgranular. Barra: 100micras. Imagen propia.

La siguiente capa a considerar es la capa de células granulares, siendo esta la célula principal en cantidad (Seress y Pokorny, 1981). Se trata de una neurona excitatoria glutamatérgica, con un cuerpo celular elíptico con un ancho de aproximadamente 10 μm y una altura de 18 μm (Claiborne, Amaral y Cowan, 1990). Los cuerpos de las células granulares están muy juntos y, en la mayoría de los casos, no hay glías interpuestas entre ellas. Por otro lado dichas células tienen un árbol dendrítico muy característico en forma de cono, con dendritas apicales espinosas cuyas ramas se extienden a lo largo de la capa molecular y los extremos distales del árbol dendrítico terminan en el hilus o en la superficie ventricular (Ramón y Cajal, 1911). El número de células granulares y su relación

con las células piramidales CA3 varía a lo largo del eje antero-posterior siendo la densidad de las células mayor en regiones anteriores que en regiones posteriores (Gaarskjaer, 1978). Si bien la capa de células granulares está formada principalmente por células granulares, hay algunos otros tipos neuronales que se encuentran en el límite de las capas granular y polimórfica, siendo esta zona conocida como la zona subgranular. El cuerpo de las células en canasta (basket cell), por ejemplo, a menudo se encuentra justo dentro de la capa de células granulares en su borde con la capa polimórfica. La célula en canasta son interneuronas GABAérgicas, paralbúmina-positivas; constituyen el tipo de interneurona inhibitoria más importante del giro dentado (Ribak y Seress, 1983). Estas células se encuentran generalmente entre la capa de células granulares y el hilus, teniendo cuerpos celulares de forma piramidal que son más grandes (25 a 35 μm de diámetro) que los de las células granulares (Claiborne et al., 1990). Las células en canasta tienen una única dendrita apical espinosa principal dirigida hacia la capa molecular que se divide en varias ramas espinosas, y varias dendritas basales que se dividen y se extienden hacia la capa de células polimórficas (Ramón y Cajal, 1911). El número de células en canasta no es constante a lo largo de las extensiones transversales del giro dentado (Seress y Pokorny, 1981).

Por último se encuentra la tercer capa, conocida como hilus o capa de células polimórficas. Esta capa generalmente se la describe como la región encerrada entre las dos capas de células granulares (CP en figura 9). Varios tipos de células se encuentran allí, pero la más relevante es la célula musgosa (Binder, Hirokawa y Windhorst, 2009). Los cuerpos celulares de las células musgosas son grandes (25 a 35 μm) y suelen tener forma triangular o multipolar. Teniendo tres o más dendritas gruesas que se originan en el cuerpo celular y se extienden a grandes distancias, cada una de estas dendritas principales se bifurca una o dos veces y generalmente da lugar a ramas laterales. (Ramón y Cajal, 1911). La característica más distintiva de la célula musgosa es que todas sus dendritas proximales están cubiertas por espinas muy grandes y complejas, las llamadas excrescencias espinosas (Amaral, 1978). El tercio interior de la capa molecular recibe una proyección que se origina exclusivamente en las neuronas del hilus (Laurberg y Sørensen 1981). Dado que en la rata esta proyección se origina tanto en el lado ipsilateral como en el contralateral del giro dentado, se la ha denominado proyección asociativa / comisural. El hecho de que las células musgosas sean positivas para el glutamato da noción de que la proyección asociativa / comisural es excitadora (Soriano y Frotscher, 1994). Las células musgosas (mossy cells) inervan tanto las células granulares como las interneuronas GABAérgicas (Scharfman, 1995). Por otra parte, las células musgosas son las receptoras de la inervación masiva de las células granulares en

su mismo nivel. Esto da a suponer que las células musgosas transmiten la salida colectiva de las células granulares de un punto a otras células granulares ubicadas en lugares distantes del giro dentado. Además de las células musgosas, hay varias células fusiformes en la capa polimórfica. La principal diferencia entre los tipos de células fusiformes es si tienen espinas o no y las formas/tamaños característicos de las espinas. Uno de los tipos, ha sido denominado célula HIPP por sus siglas en inglés (célula asociada a la ruta perforante hiliar) teniendo como característica llamativa la distribución de espinas largas y ramificadas sobre su cuerpo celular y sus dendritas (Han, Buhl, Lörinczi y Somogyi, 1993). Estas células también son presumiblemente inhibitorias de las células granulares. También hay células multipolares o triangulares en la capa polimórfica con dendritas finas y espinosas que se extienden tanto dentro del hilio como dentro de la capa molecular. Los axones de estas células, llamadas HICAP por sus siglas en inglés (células relacionadas con la vía de asociación de la comisura hiliar) se extienden a través de la capa de células granulares y se ramifican en el tercio interno de la capa molecular (Sik, Penttonen y Buzsaki, 1997).

Actividad neurogénica en el Giro dentado:

Se denomina neurogénesis al proceso por el cual se generan nuevas neuronas a partir de células madre y/o células progenitoras (Altman y Das, 1965). La neurogénesis ocurre principalmente durante el desarrollo embrionario, pero también continúa en ciertas regiones del cerebro durante toda la vida, incluso la vida adulta de los individuos, indistintamente de la especie. Sin embargo, el nivel de neurogénesis adulta disminuye significativamente a medida que se avanza en la escala evolutiva (Kempermann, 2015). Esto se evidencia al observar que la neurogénesis adulta en mamíferos está restringida a tres zonas encefálicas como son la zona subgranular del giro dentado del hipocampo (Altman, 1969), la zona subventricular de los ventrículos laterales y el bulbo olfatorio (Fabel y Kempermann, 2008); mientras que los vertebrados no mamíferos muestran una mayor frecuencia y dispersión de la actividad neurogénica adulta que implica a varias regiones del encéfalo (Ganz y Brand, 2016). Si bien los estudios que evalúen las diferencias en la neurogénesis adulta en diferentes grupos de animales son pocos, son conocidos algunos conceptos. Por ejemplo, una característica común de los vertebrados no mamíferos como peces, anfibios y reptiles es que además de una neurogénesis adulta generalizada, ocurre también un importante crecimiento cerebral post-embrionario. Este fenómeno ocurre en menor medida en aves y mamíferos, por lo que es probable que la neurogénesis adulta en peces, ranas y reptiles esté relacionada con el crecimiento coordinado de los sistemas sensoriales y las correspondientes regiones sensoriales del cerebro. Esto ha llevado a proponer que lo que ocurre en estos grupos animales

es en esencia, la continuidad en la vida adulta de un proceso que comenzó durante el desarrollo fetal. Este concepto, implica al mismo tiempo proponer que el significado biológico del mismo fenómeno es diferente, según se trate de peces, reptiles y anfibios o se trate de aves y mamíferos. Mientras en los primeros es parte de su desarrollo, en los segundos sería una respuesta adaptativa al ambiente que lo proveen de nuevas herramientas para adaptarse, por ejemplo generar y almacenar nueva información (Grandel y Brand, 2012). El caso de las aves requeriría un análisis particular, pues tiene a su vez diferencias con los mamíferos. Un caso paradigmático es el vinculado al desarrollo del canto en algunas especies de aves, el cual es dependiente del desarrollo de circuitos específicos a tal fin. Cuando el desarrollo del canto está asociado al comportamiento reproductivo y por lo tanto a ciclos anuales, la generación y destrucción masiva de neuronas ocurre una estación tras otra (Nottebohm, 2004). En estos casos, podría especularse que la neurogénesis en esos animales opera como un mecanismo transitorio para generar información (como memoria) que se descarta cuando ya no sea necesaria (Grandel y Brand, 2012). Otra característica es que las neuronas se agregan principalmente al bulbo olfatorio en los mamíferos orientados al olfato mientras que en aquellos donde lo visual es más importante como primates y aves, el bulbo olfatorio pierde importancia relativa.

Si bien en mamíferos, la neurogénesis adulta es menor a la presente en otros grupos animales, se presume que este proceso sigue siendo de relevancia, pues implica la generación continua de nuevas neuronas que se van integrando a redes ya existentes. En condiciones fisiológicas, la neurogénesis adulta en mamíferos se da principalmente en el bulbo olfatorio y el giro dentado del hipocampo. Estas áreas producen subconjuntos muy específicos de nuevas neuronas: El bulbo olfatorio incorpora nuevas células provenientes de las regiones sub ventriculares laterales, las cuales luego se diferencian in situ en interneuronas GABAérgicas llamadas granulares y periglomerulares, (Lledo, Alonso y Grubb, 2006). Mientras tanto, el giro dentado produce células granulares de tipo glutamatérgico (Zhao, Deng y Gage, 2008).

Enfocando específicamente en el giro dentado, estudios realizados en los últimos años han llegado a la conclusión de que la neurogénesis adulta es necesaria para la correcta función del hipocampo. Cada día se agregan neuronas nuevas al giro dentado en roedores jóvenes, las cuales representan una fracción relevante del total de las neuronas presentes en la capa de células granulares (Cameron y Mckay, 2001). Esta tasa de neurogénesis es modulada por claves medio ambientales; por ejemplo, puede incrementarse sustancialmente con el ejercicio, el aprendizaje o al trasladar a un animal a un entorno nuevo o enriquecido (Van Praag, Shubert, Zhao y Gage, 2005; Fabel y Kempermann,

2008). Consistentemente, se ve disminuida en animales sometidos a diferentes tipos de estrés (Gould, Tanapat, McEwen, Flügge y Fuchs, 1998). La morfogénesis de la capa granular de un roedor comienza durante el desarrollo embrionario y finaliza durante las primeras semanas posnatales. Estudios han demostrado que las células granulares nacidas en el embrión forman las porciones externas de la capa granular, mientras que las células nacidas postnatalmente migran a través del hilio hacia la capa granular preexistente y llenan la capa en un patrón de afuera hacia adentro (Altman y Bayer, 1990). La neurogénesis adulta parece contribuir a mantener ese patrón, ya que las células granulares nacidas en adultos migran radialmente desde la zona subgranular, pero permanecen posicionados principalmente dentro del tercio interno de la capa granular (Kempermann, Gast, Kronenberg, Yamaguchi y Gage, 2003). Estudios recientes han revisado el modelo de capas de afuera hacia adentro en particular en la neurogénesis adulta (Muramatsu, Ikegaya, Matsuki y Koyama, 2007). En dichos estudios se utilizaron retrovirus o bromodeoxiuridina para marcar las células granulares nacidas durante el desarrollo embrionario o postnatal temprano, así como en el giro dentado del adulto, y su localización se analizó en la capa granular adulta en momentos posteriores. La conclusión fue que la neurogénesis adulta produce una capa granular heterogénea, con las capas internas que contienen una alta proporción de células granulares nacidas en adultos y las capas externas contienen principalmente células granulares maduras generadas durante la vida embrionaria. Estudios electrofisiológicos también han apoyado esta teoría, observando que las regiones internas de la capa granular adulta son muy dinámicas y experimentan una adición continua de poblaciones neuronales, mientras que la capa granular externa parece permanecer sin cambios (Wang, Scott y Wojtowicz, 2000).

En cuanto a la integración funcional de neuronas nacidas en adultos se ha propuesto que el hipocampo adulto genera continuamente nuevas neuronas para brindarle a la red neuronal preexistente propiedades funcionales necesarias para el procesamiento de la información en el hipocampo, pero que están ausentes en todas las demás células de la capa generada durante el desarrollo embrionario (Wang et al., 2000). Esto vuelve a la neurogénesis un proceso fundamental para el correcto desarrollo de la vida adulta. Es importante indicar las diferencias entre los procesos de neurogénesis embrionaria y adulta. Una de estas diferencias es que son distintos los entornos donde se da el crecimiento neuronal en el cerebro perinatal y adulto. En el hipocampo perinatal está ocurriendo una neurogénesis y “cableado” masivos (las redes neurales están comenzando a formarse). Además, la actividad está dominada por interneuronas GABAérgicas que ejercen acciones despolarizantes. Mientras que en el hipocampo adulto existe un entorno donde las redes glutamatérgicas y GABAérgicas ya están completamente establecidas y son

las nuevas células granulares quienes deben encontrar la manera de integrarse en redes funcionales. Estas diferencias pueden dar a entender que las células granulares generadas en cualquier etapa podrían, en principio, desarrollarse con diferentes fenotipos funcionales. Esta idea se ve reforzada por el hecho que las células granulares generadas durante el desarrollo embrionario son menos excitables (Laplagne et al., 2007). Esto da entender una activación muy escasa de esta población neuronal y en consecuencia, niveles bajos de actividad neuronal en la capa granular externa. Por el contrario, todas las células granulares maduras generadas postnatalmente (en el recién nacido o adulto) resultan equivalentes en cuanto a sus características fisiológicas independientemente de la etapa de desarrollo en la que se produjeron. Independientemente de lo anterior, para ser funcionalmente relevantes las nuevas células granulares deben integrar redes excitadoras e inhibitoras, siendo capaces de recibir, procesar y transmitir información dentro de las mismas. Estudios morfológicos y fisiológicos han demostrado que las células granulares nacidas en adultos presentan dichas características, (Toni et al., 2008; Hastings y Gould, 1999; Faulkner et al., 2008).

Las neuronas nacidas de adultos se desarrollan durante varias semanas para adquirir propiedades funcionales. Durante el desarrollo, las células recién nacidas expresan características fisiológicas que son típicas de las neuronas inmaduras, como mayor excitabilidad intrínseca y reducción de la inhibición GABAérgica, lo que las hace funcionalmente únicas (Espósito et al., 2005). Debido a su mayor excitabilidad, se ha propuesto que las células granulares inmaduras podrían involucrarse en el procesamiento de información en el giro dentado, codificando la memoria de eventos que ocurren dentro de una ventana de tiempo estrecha (Aimone, Wiles y Gage, 2006). De hecho, las neuronas inmaduras podrían estar listas para participar en el procesamiento de la información antes de que se complete su desarrollo, aproximadamente a las 3 o 4 semanas (Mongiat y Schinder, 2011). Se ha examinado in vivo la activación de células recién nacidas utilizando la expresión de marcadores que indican la actividad neuronal después del aprendizaje y la exploración espacial (Jessberger y Kempermann, 2003). Por ejemplo, las nuevas células granulares de ratones expuestos a un entorno enriquecido a las 2 semanas de edad tenían más probabilidades de activarse en momentos posteriores por el mismo entorno que por uno diferente, lo que sugiere que las neuronas inmaduras procesan información espacial (Tashiro, Makino y Gage, 2007). A medida que las neuronas maduraron, la activación se volvió aún más prominente, lo que sugiere que es más probable que las células granulares nacidas en adultos participen en el procesamiento de información durante el aprendizaje espacial. También se informó una predilección notable hacia la activación de células producidas mediante neurogénesis adulta con más de 5 meses de vida, después de la exploración espacial en ratas adultas (Ramirez-

Amaya, Marrone, Gage, Worley y Barnes, 2006). Estos hallazgos revelan un reclutamiento preferencial de células granulares nacidas en adultos que comienza durante las etapas de desarrollo neuronal tempranas pero que continúa durante varios meses, luego de que las nuevas células granulares hayan alcanzado un fenotipo maduro. En este contexto, es posible hipotetizar sobre un rol biológico específico para las células granulares inmaduras y uno diferente para las células granulares maduras.

Neurogénesis: generación de precursores y diferenciación neuronal:

La neurogénesis adulta se divide típicamente en cuatro fases: fase de células precursoras, de supervivencia temprana, de maduración postmitótica y de supervivencia tardía. Dentro de ellas, en base a la morfología celular y sobre todo de proteínas marcadoras, se pueden identificar seis tipos distintos de células, o mejor dicho, seis estadios diferentes durante el proceso de diferenciación (Steiner et al., 2006). Estos tipos celulares inician con una célula precursora radial similar a una glía radial, que progresa secuencialmente en tres etapas progenitoras identificables asociadas con una alta actividad proliferativa; luego ocurre una fase de maduración postmitótica y finalmente una nueva célula granular adulta (Brandt et al., 2003).

a) Fase I. Estadio de células precursoras

La neurogénesis del hipocampo del adulto se origina a partir de una población de células precursoras con propiedades gliales. Un subconjunto de éstas muestra las características morfológicas y antigénicas de la glía radial, su cuerpo celular se encuentra en la zona subgranular y durante el transcurso del proceso, se irá extendiendo hacia la capa molecular. In vivo, las células precursoras del hipocampo fueron aisladas por primera vez del cerebro de rata embrionario (Ray, Peterson, Schinstine y Gage, 1993) y luego del cerebro de rata adulta (Palmer, Ray y Gage, 1995). Dichas células precursoras muestran algunas características de células madre como son la autorrenovación y el potencial múltiple (Palmer, Takahashi y Gage, 1997). Esta población celular representa un reservorio en gran parte inactivo, y el control de la inactividad está bajo el control de GABA que proviene de las interneuronas locales, las células en cesto (Song et al., 2012). Pero si se estimulan adecuadamente, estas células precursoras pueden dar inicio al proceso de generación de nuevas neuronas adultas. Siendo importante destacar que las células precursoras en el hipocampo adulto son heterogéneas en sus propiedades incluso en las etapas aparentes de desarrollo que pueden identificarse (Bonaguidi, Song, Ming y Song, 2012). Este tipo celular

descripto, es conocido como células tipo 1 y dan lugar a células progenitoras intermedias, denominadas células tipo 2a y tipo 2b. Estas muestran una alta actividad proliferativa y dentro de ellas, un subconjunto de estas células todavía expresa marcadores gliales como GFAP, pero carecen de la morfología característica de las células radiales (tipo 2a). Las células de tipo 2, junto con las de tipo 1, expresan nestina y en ellas aparecen los primeros indicios de elección de la línea neuronal como lo son algunos marcadores. Estos marcadores comprenden, entre otros, los factores de transcripción NeuroD1 y Prox1. Este fenotipo celular que es positivo a dichos marcadores se ha denominado célula de tipo 2b (Steiner et al., 2006). Dentro de los marcadores, Prox1 es específico para el desarrollo de células granulares (Karalay et al., 2011). Las células de tipo 2 también se caracterizan por su expresión de Eomes (Tbr2), un factor de transcripción que, durante el desarrollo cortical embrionario, identifica las células progenitoras basales, que mantienen propiedades de autorrenovación y pueden diferenciarse en neuronas (Hodge et al., 2008). Las células del tipo 2a tienen la particularidad de ser células en desarrollo que no obstante pueden recibir una primera entrada sináptica, siendo ésta GABAérgica (Tozuka, Fukuda, Namba, Seki y Hisatsune, 2005). Además, es donde se toma una decisión de elección del destino; todas las células posteriores expresan NeuroD1 y Prox1 y no hay superposición entre NeuroD1 y Prox1 y marcadores astrocíticos en ningún momento. Otro marcador presente es Tailless (Tlx) siendo un factor de transcripción involucrado en el control de la transición entre los fenotipos glial y neuronal de las células precursoras (Shi et al., 2004).

Entre los marcadores de linaje neuronal que aparecen por primera vez en la etapa de tipo 2b se encuentra doblecortina (DCX), siendo éste un marcador ampliamente utilizado para estudiar la neurogénesis adulta. La expresión de DCX se extiende desde la etapa de proliferación, pasando por la salida del ciclo celular, hasta el período de maduración posmitótica que dura de 2 a 3 semanas (Brandt et al., 2003).

b) Fase II. Neuroblastos en fase de supervivencia temprana

Esta fase es la que ocurre inmediatamente después de la salida del ciclo celular: en este momento, las células migran desde su lugar de origen al sitio final de diferenciación, ambos usualmente muy cercanos. Ahora, las nuevas neuronas expresan marcadores postmitóticos, como NeuN y el marcador transitorio calretinina (Brandt et al., 2003). El número de nuevas neuronas positivas para NeuN es más alto en momentos muy tempranos y disminuye drásticamente en unos pocos días. Debido a que durante esta fase ocurre un proceso apoptótico de eliminación muy marcado (Biebl, Cooper, Winkler y Kuhn, 2000). Cuantitativamente, este proceso de apoptosis es considerado el mayor regulador

de todo el proceso y es donde la influencia medioambiental es determinante. Las células que hayan sobrevivido las primeras 2 semanas estarán integradas de manera estable y persistente en la red del giro dentado durante mucho tiempo. Después de este momento, sólo ocurren cambios muy pequeños en el número de células. Por lo tanto, la mayoría de las células generadas se eliminan mucho antes de que hayan establecido conexiones funcionales en el área objetivo CA3 o hayan recibido información dendrítica concreta desde la corteza entorrinal en la capa molecular del giro dentado. También es en esta etapa que se comienza el desarrollo de dendritas y axones. El inicio del desarrollo de las dendritas parece ser muy variable pero una vez iniciado el curso temporal del desarrollo es muy estable. Días después de la salida del ciclo celular, y una vez ya generadas las dendritas, las nuevas células comienzan a producir su axón dirigiéndolo al área CA3, donde forman las sinapsis apropiadas (Sun et al., 2013). Esta fase está asociada con la expresión de la proteína mediadora de respuesta al colapso (Crmp, también conocida como TOAD-64 o TUC-4). Durante esta etapa la principal entrada sináptica a las nuevas células sigue siendo GABAérgica, donde el GABA tiene un efecto excitatorio. El GABA cambia a su función inhibitoria sólo cuando se ha hecho suficiente contacto glutamatérgico y, presumiblemente, cuando las células han comenzado a desarrollar su propio fenotipo de neurotransmisor glutamatérgico (Tozuka et al., 2005).

c) Fase III. Neuroblastos en fase de maduración posmitótica

En esta etapa ocurre la formación de sinapsis glutamatérgicas siendo este el principal acontecimiento de la etapa (Chancey et al., 2013). El momento exacto en el que ocurra dependerá de la actividad presente en los circuitos locales (Piatti et al., 2011). Durante esta etapa también ocurre una elongación de los axones y luego la formación de la columna en las dendritas siendo ambas reguladas de forma precisa y compleja (Sun et al., 2013). Para conectarse a las células blanco en CA3, los axones de las nuevas neuronas deben competir con las sinapsis existentes en los botones de las células musgosas (Toni et al., 2007).

d) Fase IV. Fase de maduración tardía

Esta fase inicia después de la integración estructural completa en la red existente, en donde las nuevas células cambian su proteína de unión al calcio de calretinina a calbindina (Brandt et al., 2003). Una vez integradas se necesitan varias semanas más hasta que las nuevas células se hayan vuelto electrofisiológicamente indistinguibles de sus vecinas más antiguas (Ambrogini et al., 2004). Aquí también ocurre que se establecen las conexiones sinápticas glutamatérgicas y las nuevas neuronas pasan por una fase de mayor plasticidad sináptica en donde el umbral para inducir potenciación post sináptica en las

neuronas inmaduras es más bajo que en las células granulares maduras (Wang et al., 2000). Este período crítico dura entre 4 y 7 semanas después de que se generaron las células (Ge et al., 2006). Algunas teorías sobre la posible función de las nuevas células granulares en la generación de memorias, se basan en este hecho argumentando que las propiedades plásticas alteradas ayudan al giro dentado a codificar información en nuevos circuitos formados por estas células (Aimone et al., 2006). Además, el aumento de la plasticidad podría servir para facilitar la integración preferencial de las nuevas células para lograr cambios a largo plazo en la red (Wiskott, Rasch y Kempermann, 2006). Por último, es de suponer que en esta etapa tienen lugar importantes eventos regulatorios pero serán más efectivos a nivel cualitativo que cuantitativo.

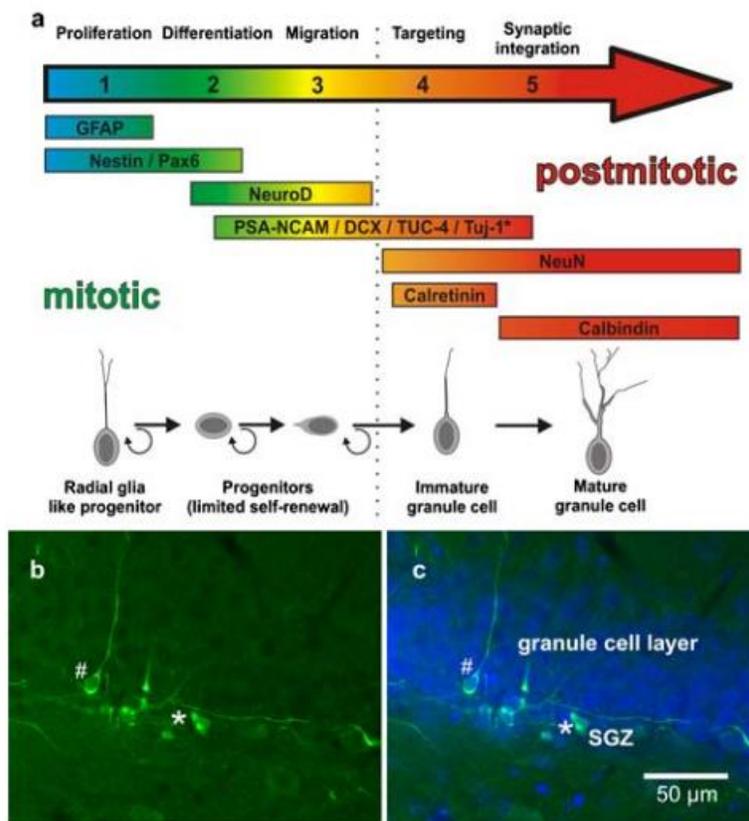


Figura 10. Diferenciación neuronal en el nicho neurogénico del giro dentado. A; La caracterización de cada etapa puede estar basada en marcadores específicos o por su fenotipo electrofisiológico. La expresión de GFAP es característica de las glías pero también en células en etapas muy iniciales de diferenciación. Por otro lado, la expresión de calbindina es típico de neuronas maduras. En este esquema, la migración es considerada una fase en sí misma y por lo tanto, suman 5. B y C; Doble marcación DCX (verde) y DAPI para evidenciar neuroblastos presentes en la región subgranular, transitando la Fase III y desarrollando sus proyecciones. Imagen tomada de Von Bohlen und Halbach, 2007.

Contribución del hipocampo al procesamiento de la información y la generación de memorias

La memoria es la capacidad que tiene el cerebro para procesar la información, codificarla, almacenarla y utilizarla cuando resulte necesario (Sherwood, 2015). Las memorias se almacenan en el cerebro como cambios en la eficiencia en la transmisión sináptica entre las neuronas, como consecuencia de la actividad sináptica previa. Las vías nuevas o facilitadas se llaman huellas de memoria (o engramas) y una vez que quedan establecidas, es posible activarlas de forma selectiva para reproducir los recuerdos (Tonegawa, Pignatelli, Roy y Ryan, 2015). Asimismo, los recuerdos a largo plazo derivan de modificaciones producidas en la conducción sináptica de los centros cerebrales inferiores. Sin embargo, la mayor parte de los recuerdos se basan en las huellas de memoria de la corteza cerebral. Una forma de clasificar la memoria es según sea dependiente o no de la conciencia. De esta forma se clasifica en memoria declarativa (o explícita) y memoria no declarativa (o implícita). Así, la memoria declarativa es aquella que utiliza un proceso consciente, mientras que la memoria no declarativa se expresa a través de cambios conductuales o fisiológicos en ausencia de conciencia.

Memoria no declarativa:

La memoria implícita o no declarativa incluye varias formas de aprendizaje que ocurren durante la ejecución de diversas tareas y, por lo general, se expresan en un desempeño conductual mejorado, acelerado o en un cambio en las opciones o valores conductuales. Por ejemplo, incluye la memoria procedimental que implica aprender una secuencia de movimientos o acciones. Este es el típico caso de la adquisición de destrezas motrices, por ejemplo aprender a andar en bicicleta. Este tipo de memoria y su vínculo con el aprendizaje procedimental el que se ve comprometido en trastornos como por ejemplo, la enfermedad de Parkinson. Otro tipo de memoria no declarativa es la conocida como memoria emocional, la cual implica el buscar o el evitar estímulos anteriores como resultado de la experiencia, como en la adquisición de preferencia por un tipo particular de comida o la aversión a los objetos con los que uno tuvo una experiencia previa desagradable. Esta memoria, que está basada en el desarrollo de condicionamientos, depende de interacciones subcorticales y corticales con la amígdala y el núcleo acumbes. Este por ejemplo, participa en la vía asociada al sentimiento de recompensa y por lo tanto de reforzamiento de un condicionamiento y es central en el desarrollo de conductas adictivas en humanos y animales.

Memoria declarativa:

La memoria declarativa también se subdivide en múltiples formas. Una de las cuales es la memoria de trabajo, memoria que implica el mantenimiento a corto plazo de la información en mente y a menudo, la manipulación de esa información con el fin de lograr un objetivo inmediato. Por otra parte, hay tres formas de memoria declarativa a largo plazo que implican recuperar información almacenada anteriormente: la memoria semántica, la memoria episódica y la memoria espacial. La memoria semántica implica la memoria para el conocimiento fáctico que se ha aprendido, pero para el que normalmente no se conoce información específica de "tiempo y lugar" sobre la fuente de la experiencia original. Esta ocurre básicamente en humanos y se considera la utilizada en el denominado conocimiento enciclopédico de información como eventos históricos, tablas matemáticas, etc. La memoria episódica implica la capacidad de aprender, almacenar y recuperar información sobre experiencias personales únicas que ocurren en la vida diaria. Estos recuerdos generalmente incluyen información sobre el momento y el lugar de un evento, así como información detallada sobre el evento en sí. La memoria episódica se encuentra vinculada a procesos que ocurren en la corteza cerebral, corteza entorrinal y el hipocampo, siendo este último el encargado de producir la integración de los estímulos y el almacenamiento de la memoria. Finalmente, la memoria espacial describe el almacenamiento y la recuperación de información necesarios para la identificación y navegación del espacio. Se han descrito dos marcos de referencia principales: egocéntrico, que se relaciona directamente con el observador, y allocéntrico, que depende de la posición relativa de los objetos en el espacio. Aunque a menudo se discute por separado, una visión emergente es que tanto las memorias espaciales egocéntricas como las allocéntricas están codificadas independientes pero estas pueden interactuar y depender de las regiones cerebrales que interactúan. Las células que responden a ubicaciones específicas se ubican principalmente en el hipocampo, mientras que las células que responden a las vistas de puntos de referencia se ubican principalmente en la región parahipocampal. De hecho, formar recuerdos de lugares o puntos de referencia o asociar objetos con ubicaciones particulares parece requerir la interacción de ambos sectores. Otras regiones fuera del hipocampo también importantes para el desempeño de tareas de memoria espacial incluyen la corteza parietal posterior y el cuerpo estriado. La primera es necesaria en la representación de la información espacial en términos de coordenadas egocéntricas, lo que permite formular planes de alcance y movimiento, así como imágenes egocéntricas. Adicionalmente, se cree que el cuerpo estriado tiene un papel en el aprendizaje de los aspectos procedimentales de las tareas y podría tener papeles en la consolidación de la memoria espacial egocéntrica y allocéntrica, (De Leonibus, Oliverio y Mele, 2005).

En función de la duración de la memoria, ésta se puede clasificar en: memoria a corto plazo, que abarca los recuerdos que duran segundos o pocos minutos; memoria a mediano plazo, que dura entre días y semanas; y memoria a largo plazo, que una vez almacenada, puede recuperarse años más tarde o incluso en cualquier momento de la vida.

Memoria a corto plazo:

La memoria a corto plazo dura unos pocos segundos o minutos (Atkinson y Shiffrin, 1968). Se ha propuesto que esta memoria a corto plazo está ocasionada por la actividad nerviosa continua derivada de señales recurrentes en torno a una huella de memoria transitoria dentro de un circuito de neuronas reverberantes (Goldman-Rakic, 1995). Otra posible explicación de la memoria a corto plazo se basa en la facilitación o la inhibición presinápticas (Lundqvist et al., 2016). Un ejemplo de mecanismo de memoria a corto plazo básico y relevante debido a su existencia en formas de vida muy primitivas así como en los animales superiores es la conocida como facilitación neuronal. La facilitación neuronal se observó inicialmente cuando se descubrió que las respuestas sinápticas se vuelven mucho más grandes cuando las células presinápticas son activadas por estímulos espaciados entre diez a cientos de milisegundos (Feng, 1940). Un protocolo experimental usual con que se estudia este fenómeno es el de "pulsos pareados". Se trata de dos estímulos, en el estímulo inicial a medida que el potencial de acción invade el botón presináptico se van abriendo canales de calcio lo que lleva a un ingreso importante de dicho ion a la zona mientras estos canales permanecen abiertos (tiempo menor a un milisegundo). Si existen vesículas presinápticas ubicadas en las inmediaciones de los canales de calcio abiertos, esta señal de calcio grande y breve activa sensores de calcio que inducen la exocitosis del neurotransmisor. La facilitación es muy breve ya que el estímulo es corto en el tiempo, la afinidad de los sensores es baja y las concentraciones de calcio bajan drásticamente a medida que se alejan de los canales. Pero el calcio entrante no sólo interactúa con los sensores mencionados, también se difunde rápidamente y se equilibra con proteínas presentes dentro de los botones presinápticos, lo que da lugar a una porción de calcio que persiste durante decenas a cientos de milisegundos antes de ser eliminado del botón sináptico. Si durante el tiempo que ese calcio residual persiste en el botón sináptico, ocurre el segundo estímulo (con el que ingresa más calcio) la concentración tan alta del ion llevará a un aumento importante en la liberación de neurotransmisores y por lo tanto una mayor probabilidad de inducir una respuesta post sináptica.

Memoria a mediano y largo plazo:

La memoria a mediano plazo puede durar desde minutos hasta semanas. Este tipo de recuerdo puede obedecer a cambios físicos o químicos transitorios o a ambos procesos ocurridos tanto en los terminales presinápticos de la sinapsis, como en su membrana postsináptica (Kandel, Dudai y Mayford, 2014). Estos cambios químicos también se deben a los procesos relacionados con la dinámica del calcio intracelular a nivel de la sinapsis o a la modificación reversible de proteínas participantes de la dinámica sináptica que favorecen la conectividad neural. Tal es el caso de la Protein-quinasa A en la presinapsis de los axones de las fibras musgosas que hacen sinapsis con las neuronas de la región CA3 del hipocampo. Aunque no existe una delimitación evidente entre memoria de mediano y largo plazo, en general se establece que la memoria a largo plazo depende de cambios estructurales sucedidos a nivel de las sinapsis y no de carácter químico como ser modificaciones covalentes de proteínas preexistentes o cambios en la concentración de intermediarios (Baddeley y Warrington, 1970). Además, estos cambios en las sinapsis producen un aumento duradero de la fuerza sináptica conocido como potenciación a largo plazo (LTP), mientras que otros patrones de actividad producen una disminución duradera de la fuerza sináptica, conocida como depresión a largo plazo (LTD). Estas formas de plasticidad sináptica proporcionan mecanismos neuronales probables para cambios duraderos en regiones del cerebro involucradas en la formación de ciertos tipos de memoria a largo plazo. Por su importancia, requieren ser tratadas más específicamente.

LTP y LTD: Los modelos celulares de la memoria.

La LTP se ha estudiado más a fondo en las sinapsis excitadoras del hipocampo de los mamíferos, un área del cerebro que es especialmente importante en la formación y/o recuperación de algunas formas de memoria. El trabajo en LTP comenzó a fines de la década de 1960, cuando se descubrió que unos pocos segundos de estimulación eléctrica de alta frecuencia pueden mejorar la transmisión sináptica en el hipocampo del conejo durante días o incluso semanas (Bliss, Burns y Uttley, 1968). Gran parte del trabajo sobre LTP se ha centrado en las conexiones sinápticas entre las colaterales de Schaffer y las células piramidales de CA1. La estimulación eléctrica de las colaterales de Schaffer genera potenciales postsinápticos excitadores (EPSP por sus siglas en inglés) en las células de CA1 postsinápticas. Si las colaterales de Schaffer se estimulan sólo dos o tres veces por minuto, el tamaño del EPSP evocado en las neuronas de CA1 permanece constante. Sin embargo, una breve serie de estímulos de alta frecuencia a los mismos axones causa LTP, que se evidencia como un aumento duradero en la amplitud del EPSP (figura 11). Es importante

aclarar que si bien en el hipocampo es donde más se ha estudiado el fenómeno, la LTP ocurre en muchas otras sinapsis en una variedad de regiones del cerebro, incluyendo la corteza, la amígdala y el cerebelo.

La LTP presenta varias propiedades que la convierten en un mecanismo neuronal atractivo para el almacenamiento de información. En primer lugar, el estado del potencial de membrana de la célula postsináptica determina si se produce o no LTP. Si un único estímulo en las colaterales de Schaffer, que normalmente no provocaría LTP, se empareja con una fuerte despolarización de la célula CA1 postsináptica, las sinapsis de las colaterales de Schaffer activadas experimentan LTP. Este aumento se produce sólo si las actividades emparejadas de las células presinápticas y postsinápticas están estrechamente vinculadas en el tiempo, de modo que la fuerte despolarización postsináptica se debe producir dentro de unos 100ms post liberación del neurotransmisor presináptico. Por otra parte, la LTP también tiene especificidad de entrada: esto quiere decir que cuando la LTP es inducida por la estimulación de una sinapsis, no ocurre en otras sinapsis inactivas que contactan con la misma neurona. Por lo tanto, la LTP se restringe exclusivamente a las sinapsis activadas. Esta característica de la LTP es consistente con su participación en la formación de la memoria, si la activación de un conjunto de sinapsis llevara a potenciar todas las demás sinapsis, incluso las inactivas, sería difícil mejorar selectivamente conjuntos particulares de entradas, como presumiblemente se requiere para almacenar información específica. Otra propiedad importante de la LTP es la conocida como asociatividad. Como se mencionó, una estimulación débil mediante una vía no desencadenará por sí misma LTP. Sin embargo, si una vía se activa débilmente al mismo tiempo que otra vía vecina a la misma célula se activa fuertemente, ambas vías sinápticas presentarán una LTP. Esta propiedad se espera en cualquier red de neuronas que vincule un conjunto de información con otro.

Los fundamentos moleculares que explican la LTP permanecieron mucho tiempo sin comprenderse. El primer avance fue al observar que los antagonistas del tipo NMDA del receptor de glutamato previenen la LTP, pero no tienen ningún efecto sobre la respuesta pre sináptica provocada por la estimulación de baja frecuencia de las colaterales de Schaffer (Harris, Ganong y Cotman, 1984). Aproximadamente al mismo tiempo, se apreciaron por primera vez las propiedades biofísicas únicas del receptor de NMDA (Muller, Joly y Lynch, 1988). Dicho canal es permeable al Ca^{2+} , pero está bloqueado por las concentraciones fisiológicas de Mg^{2+} . Por tanto, durante la transmisión sináptica de baja frecuencia, el glutamato liberado por las colaterales de Schaffer se une tanto a los receptores de glutamato de tipo NMDA como a los de tipo AMPA / kainato. Si bien ambos tipos de receptores unen glutamato, cuando la neurona postsináptica se

encuentra en su potencial de membrana en reposo normal, los canales de NMDA estarán bloqueados por iones Mg^{2+} y no fluiría corriente. Dado que el bloqueo del canal NMDA por Mg^{2+} depende del voltaje, la función de la sinapsis cambia notablemente cuando se despolariza la región postsináptica. Por lo tanto, para inducir LTP, como durante la estimulación de alta frecuencia, es necesaria una despolarización prolongada que resulte en la expulsión de Mg^{2+} del canal NMDA. La eliminación de Mg^{2+} permite que el Ca^{2+} entre en la neurona postsináptica y el aumento resultante en la concentración de Ca^{2+} dentro de las espinas dendríticas de la célula postsináptica resulta ser el desencadenante de la LTP. El receptor de NMDA se comporta así como una puerta molecular: el canal se abre (para inducir LTP) solo cuando el glutamato se une a los receptores de NMDA y la célula postsináptica se despolariza para aliviar el bloqueo de Mg^{2+} del canal de NMDA. Por tanto, el receptor de NMDA puede detectar la coincidencia de dos eventos. Estas propiedades del receptor NMDA pueden explicar muchas de las características de la LTP. La especificidad espacial de la LTP puede explicarse por el hecho de que los canales de NMDA se abrirán solo en las regiones post sinápticas que están despolarizadas por glutamato, lo que limita la LTP a estos sitios. Con respecto a la asociatividad, una entrada débilmente estimulada libera glutamato, pero no puede despolarizar suficientemente la célula postsináptica para aliviar el bloqueo de Mg^{2+} . Sin embargo, si las entradas vecinas están fuertemente estimuladas, proporcionan la despolarización "asociativa" o sumación espacial, necesaria para aliviar el bloqueo y generar LTP. Durante la inducción de la LTP y a consecuencia del incremento de la concentración de Ca^{2+} , se producen cambios en la sensibilidad de la célula postsináptica al glutamato. En efecto, las sinapsis excitadoras pueden regular dinámicamente sus receptores de glutamato postsinápticos e incluso pueden agregar nuevos receptores AMPA a sinapsis silenciosas que no tenían previamente receptores AMPA postsinápticos. El mantenimiento de LTP se debe a dicha inserción de receptores AMPA en la membrana postsináptica (en contraposición a su "inducción", que depende de la actividad de los receptores NMDA).

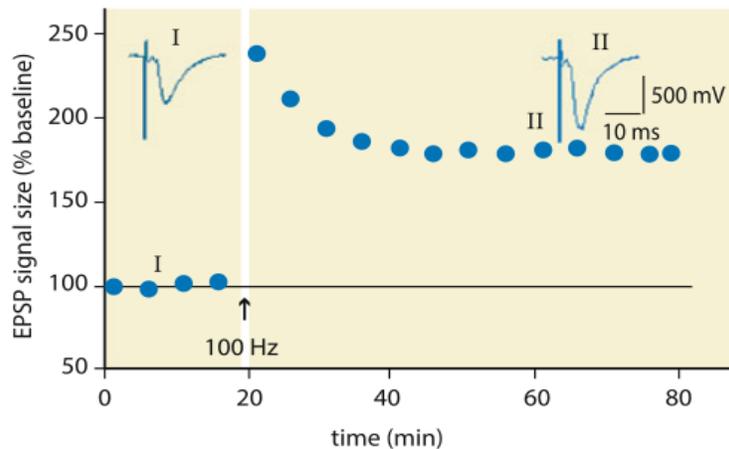


Figura 11. Potenciación a largo plazo. Luego de la aplicación de un tren de estímulos de 100Hz, la amplitud de los potenciales postsinápticos resulta muy aumentada respecto a los valores basales registrados antes del estímulo. Nótese que la amplitud de estos potenciales es muy grande inmediatamente luego del estímulo, estabilizándose en valores intermedios que se mantienen en el tiempo. Los altos valores en los primeros instantes pueden ser atribuidos a fenómenos pre sinápticos. Imagen tomada de Galizia & Lledo, (2013).

Si las sinapsis simplemente siguieran aumentando en fuerza como resultado de LTP, esto dificultaría la codificación de nueva información. Por lo tanto, para que el fortalecimiento sináptico sea útil, otros procesos deben debilitar selectivamente conjuntos específicos de sinapsis. Este proceso es el conocido como depresión a largo plazo (LTD). A finales de la década de 1970, se descubrió que LTD se producía en las sinapsis entre las colaterales de Schaffer y las células piramidales CA1 en el hipocampo. Mientras que la LTP en estas sinapsis requiere una estimulación breve de alta frecuencia, la LTD se produce cuando las colaterales de Schaffer se estimulan a una frecuencia baja, aproximadamente 1 Hz, durante períodos prolongados (10 a 15 minutos). Este patrón de actividad deprime el EPSP durante varias horas y al igual que la LTP, es específico de las sinapsis activadas. Además, la LTD puede borrar el aumento en el tamaño de las EPSP debido a LTP y, a la inversa, la LTP puede borrar la disminución en el tamaño de EPSP debido a LTD. Esta complementariedad sugiere que LTD y LTP afectan de manera reversible la eficiencia sináptica actuando en un sitio común.

Tanto la LTP y LTD en las sinapsis entre las colaterales de Schaffer - CA1 comparten varios elementos clave. Ambos requieren la activación de los receptores de glutamato de tipo NMDA y la entrada resultante de Ca^{2+} en la célula postsináptica. El principal determinante de si surge LTP o LTD parece ser la

cantidad de Ca^{2+} en la célula postsináptica: pequeños aumentos de Ca^{2+} conducen a depresión, mientras que grandes aumentos desencadenan la potenciación. En ese sentido, la LTD parece resultar de la activación de fosfatasa dependientes de Ca^{2+} que escinden los grupos fosfato de los objetivos. La evidencia que respalda esta idea es que los inhibidores de la fosfatasa previenen la LTD, pero no tienen ningún efecto sobre la LTP. Los diferentes efectos de Ca^{2+} durante la LTD y LTP pueden surgir de la activación secuencial y selectiva de proteínas fosfatasas y quinasas por niveles bajos y altos de Ca^{2+} . Si bien aún no se han identificado los sustratos de fosfatasa importantes para LTD, es posible que LTP y LTD fosforilen y desfosforilen el mismo conjunto de proteínas reguladoras para controlar la eficacia de la transmisión en la sinapsis CA1 colateral de Schaffer. Así como la LTP en esta sinapsis se asocia con la inserción de receptores AMPA, la LTD a menudo se asocia con una pérdida de receptores AMPA sinápticos. Esta pérdida probablemente se deba a la internalización de los receptores AMPA en la célula postsináptica, debido al mismo tipo de mecanismos de endocitosis dependientes de clatrina que son importantes para el reciclaje de vesículas sinápticas en la terminal presináptica.

Consolidación de la memoria o aprendizaje:

Para que la memoria a corto plazo se transforme en memoria a largo plazo capaz de evocarse semanas o años más tarde, debe quedar consolidada. Es decir, si la memoria a corto plazo se activa repetidas veces, las sinapsis sufrirán cambios estructurales del tipo de los recién descritos y que a la postre son los responsables del tipo de memoria a largo plazo (Burnham, 1903; Squire, Clark y Knowlton, 2001). Uno de los rasgos más importantes de la consolidación es que los recuerdos nuevos se codifican en clases diferentes de información. Durante este proceso se comparan las semejanzas y las diferencias entre lo nuevo y lo antiguo, y parte del proceso de almacenamiento consiste en acumular la información acerca de estas semejanzas y diferencias, en vez de almacenar los recuerdos nuevos sin procesar. Por tanto, durante la consolidación, los recuerdos nuevos no se depositan al azar en el cerebro sino que se conservan en asociación directa con otros recuerdos del mismo tipo (Squire, Genzel, Wixted y Morris, 2015). Cuando la consolidación se establece, la memoria ya no es lábil y queda bien asentada, pero en caso de reactivar ese recuerdo, éste puede modificarse y se torna lábil nuevamente. Esto nos lleva directamente al concepto de reconsolidación, que es el proceso por el cual esa memoria modificada, vuelve a consolidarse. Esto puede ocurrir de dos formas distintas y no excluyentes: una sería que durante la activación se incorpore algo nuevo al conocimiento ya establecido, incorporándose nuevos componentes al circuito neuronal involucrado. Este es un mecanismo básico del aprendizaje ya que como se mencionó

anteriormente, para establecer lo aprendido es fundamental la asociación entre conceptos viejos y nuevos. Por otra parte, podría ocurrir que la reactivación no incorpore nuevos componentes y el proceso de reconsolidación asiente exactamente en el mismo circuito, que ahora queda con “mayor fuerza” y será más fácil de ser reactivado nuevamente. Esta última forma es la que se da por ejemplo cuando se aprenden movimientos mecánicos mediante la práctica repetida de los mismos.

En un principio se pensaba que el aprendizaje por alteraciones en la cantidad de neuronas en los circuitos de memoria era poco relevante, sin embargo, cada vez más las investigaciones marcan que este mecanismo es relevante, incluso en adultos (Dudai y Morris, 2013). Un ejemplo de esto es la memoria espacial. En animales de experimentación, la memoria espacial se evalúa típicamente mediante la realización del laberinto de agua de Morris (MWM por sus siglas en inglés), laberinto que consiste en una piscina circular llena de agua, dentro de la cual se encuentra una pequeña plataforma de escape escondida; se deposita al animal en la piscina y el mismo tiende a buscar la plataforma. Durante la repetición del ensayo, los animales aprenden a encontrar la plataforma y cada vez demoran menos tiempo y recorren menos distancia para encontrarla. Mediante esta prueba se ha demostrado que aquellos animales que tienen impedida la neurogénesis adulta presentan peores resultados, lo cual puede explicarse por una afección de su memoria espacial. Esto justifica la hipótesis por la cual la neurogénesis adulta estaría vinculada en la producción de memoria espacial (Dupret et al., 2008)

La proteína DBC1 y su posible función en la regulación de la neurogénesis:

Deleted in Breast Cancer – 1 (DBC-1) es una proteína nuclear que ha sido descrita en forma relativamente reciente (Kim et al., 2008; Zhao, Kruse, et al., 2008). No teniendo adjudicadas funciones claras aún, en un principio la proteína fue propuesta como ausente en algunos tipos de cáncer de mama (Hamaguchi et al., 2002), sin embargo hasta el día de hoy no hay evidencia firme de que esté relacionada con el desarrollo del cáncer. Actualmente DBC-1 se propone como un regulador metabólico a nivel hepático (Escande et al., 2013; Santos et al., 2019), del metabolismo del tejido adiposo y de la apoptosis (Chini, Escande, Nin y Chini, 2012). Su función reguladora se basa en la interacción directa con sus proteínas blanco y la consiguiente represión de su función. A propósito, se ha determinado que la misma es capaz de regular la actividad de la sirtuina 1 (SIRT1), una desacetilasa dependiente de NAD (Escande et al., 2010); esta proteína ha generado gran interés en los últimos años puesto que el aumento de su actividad

biológica se correlaciona con una menor prevalencia de enfermedades crónicas como diabetes, obesidad y cáncer, y por lo tanto mayor longevidad (Libert et al., 2011). Por otro lado, se ha involucrado a SIRT1 con aspectos relacionados al sistema nervioso central como la modulación de la ansiedad, la memoria, el aprendizaje y la protección contra enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Corpas et al., 2016).

La función de DBC1 en el sistema nervioso central es presumiblemente relevante ya que se encuentra sumamente expresada en el cerebro y en particular en el giro dentado del hipocampo adulto, aunque no todas las neuronas del mismo la parecen expresar de la misma forma (Varela, 2016). Por otro lado, en el sistema nervioso periférico (SNP) se ha determinado que SIRT1 produce protección contra la degeneración Walleriana y al DBC1 ser capaz de regular la expresión de SIRT1 en el SNP, se ha postulado que esta proteína tendría un rol de suma importancia durante los procesos degenerativos (Calliari et al, 2014).

La funcionalidad de la proteína es afectada por la proteólisis de un dominio de interacción con otras proteínas, la región amino-terminal (Figura 12). Así en el caso de SIRT1 y otras proteínas, el dominio LZ (cierre de leucina) ubicado en esa región es considerado el responsable de la interacción. Estas observaciones llevan a pensar que la forma clivada de la proteína es una forma inactiva de DBC1. Se ha observado que la forma clivada de DBC1 (llamada DN-DBC1), se regula rápidamente a la baja cuando células quiescentes vuelven a entrar en el ciclo celular (Santos et al., 2019). Este concepto se ha reforzado mediante el análisis de la expresión de diferentes ARNm que codifican ciclinas que confirmó que los ratones KO para DBC1 tenían alteraciones en la progresión del ciclo celular, en comparación con los ratones WT (Santos et al., 2019). Otros estudios sugieren que la relación DBC1 / DN-DBC1 podría ser un marcador para diferentes estadios del ciclo celular. Por ejemplo, se ha demostrado recientemente que SIRT1 regula SASP (fenotipo secretor asociado a senescencia por sus siglas en inglés) (Hayakawa et al., 2015), lo que sugiere que puede ser necesaria una regulación negativa de DN-DBC1 para el establecimiento de SASP en células senescentes. El hecho de que DN-DBC1 se pierda tanto en células inactivas que sufren apoptosis como en células senescentes sugiere que DN-DBC1 no es solo un marcador de células inactivas, sino que también puede ser un regulador clave en la decisión del destino celular al dejar la quiescencia, ya sea para volver a entrar en el ciclo celular, sufrir apoptosis o entrar en senescencia celular (Santos et al., 2019). En consistencia con lo anterior, se ha demostrado que en ausencia de DBC1, la transición G0-proliferación se encuentra afectada in vivo en un modelo de regeneración hepática. Durante la regeneración hepática, los hepatocitos expresan prevalentemente la forma completa de DBC1 y

gradualmente comienzan a expresar DN-DBC1 a medida que se completa el proceso regenerativo. Estas evidencias sugieren que el balance DBC1/DN-DBC1 regula la capacidad de las células quiescentes de retomar el ciclo celular cuando así es requerido. Una pregunta que surge directamente a partir de lo anterior es si esta función asociada al control del ciclo celular será válida sólo para la regeneración hepática o estaremos frente a un mecanismo general, con impacto mucho más amplio en la biología celular. Tal podría ser el caso en la neurogénesis adulta.

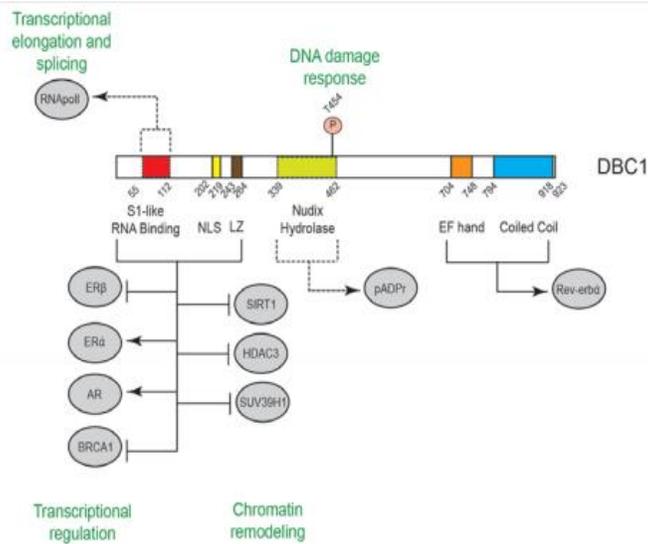


Fig. 12: Representación de DBC1 mostrando sus dominios y principales interacciones. Imagen tomada de Joshi et al., 2013.

HIPOTESIS:

Basándonos en la evidencia disponible, según la cual: a) DBC1 podría estar participando del control del ciclo celular; b) DBC1 está altamente expresada en el giro dentado del hipocampo; c) el giro dentado del hipocampo es una de las pocas regiones del cerebro adulto con células fuera de G0 capaces de diferenciarse en neuronas, es que nos planteamos la hipótesis según la cual DBC1 podría estar regulando la actividad neurogénica en el giro dentado del hipocampo.

De acuerdo a esta hipótesis, esperamos encontrar: a) diferencias en la expresión de DBC1 en el hipocampo, según la edad del individuo (asociadas a periodos de tiempo con mayor o menor neurogénesis); b) que la neurogénesis se verá afectada en los animales KO para DBC1, lo que a su vez; c) generará algún tipo de alteración morfológica del giro dentado.

OBJETIVOS GENERALES Y ESPECIFICOS:

Objetivo general:

Estudiar el papel que podría caberle a DBC1 en el control de la neurogénesis en el cerebro adulto del ratón, en particular en el hipocampo.

Objetivos específicos:

- 1- Caracterizar la expresión de DBC1 en el hipocampo de animales de diferentes edades.
- 2- Determinar si existen cambios en la tasa neurogénica en el giro dentado de animales KO para DBC1 en relación a los animales controles, utilizando marcadores de ciclo celular y de neuroblastos, utilizando inmunofluorescencia, inmunohistoquímica y Western Blot.
- 3- Determinar si la ausencia de DBC1 produce cambios morfológico - estructurales en el giro dentado.

MATERIALES Y METODOS:

Para realizar el objetivo específico 1 se obtuvieron las muestras de hipocampo necesarias de ratones BL6C57, machos, de fenotipo normal (WT) y con el gen codificante para DBC1 inactivado (animales KO), albergados en bioterio del Instituto Pasteur de Montevideo. Los animales fueron sacrificados por decapitación a diferentes edades (1 semana, 8 semanas, 30 semanas y 105 semanas) y sus cerebros extraídos. Bajo lupa y sobre una superficie fría (4°C) se realizó un corte en plano sagital dividiendo al cerebro en sus hemisferios, de uno de ellos se extrajo el hipocampo y se almacenó a -80°C hasta su uso para la extracción de proteínas. Mientras que la otra mitad fue fijada en paraformaldehído al 4%.

Las muestras de hipocampo destinadas a la extracción de proteínas se procesaron realizando una homogeneización con un buffer de lisis para extraer sus proteínas (100 mM NaCl, buffer tris 20 mM pH 7.4, igepal 0.25% y 5 mM EDTA), luego fueron centrifugadas a 10.000g por 10 minutos a 4°C. A partir del sobrenadante de la muestra centrifugada se cuantificó la concentración de proteínas por el método de Bradford para posteriormente realizar una electroforesis en gel de acrilamida al 8%, continuándose con la práctica de Western Blot. La detección de las proteínas de interés se realizó utilizando anticuerpos específicos para DBC1 (Bethyl Labs, catA300-434A), doblecortina (DCX, Cell Singaling, cat#4604) y β -actina, como control de carga (Merck, #A5441). Para la detección de los anticuerpos ligados a la proteína blanco, se utilizaron anticuerpos secundarios unidos a peroxidasa (Merck, #A0545), siendo el revelado en base a quimioluminiscencia (NovexECL, Invitrogen catWP20005) sobre una placa radiográfica y luego cuantificada mediante una densitometría utilizando software ImageJ. Las diferencias entre condiciones experimentales (edades), se evaluaron mediante el empleo de test de ANOVA de una vía.

Para el cumplimiento del objetivo específico 2 se procedió al procesamiento de los hemisferios fijados en paraformaldehído. La población de nuevas neuronas del hipocampo fue detectada por marcación específica con anticuerpos e inmunofluorescencia sobre cortes obtenidos por congelación. Para ello en primer término se realizó una crioprotección con sacarosa al 30% y luego la inclusión en medio hidrofílico (Tissue Tek-OCT compound). Los bloques se mantuvieron a -20°C hasta el momento de realizar cortes coronales seriados de todo el giro dentado, de 20 micras de espesor utilizando criostato. Para la inmunomarcación se seleccionaron 3 zonas diferentes (anterior, media y posterior) lo que permitió tener un resultado global del giro dentado y evitar sesgos según la zona estudiada. Se realizó inmunofluorescencia en animales WT y KO para DBC1 utilizando alternativamente anticuerpos primarios que reconocen las proteínas

DBC1, el marcador de células en proliferación Ki67 (Cell Signaling, cat#2129S) y doblecortina (DCX) marcador de proteínas que se asocian a microtúbulos de neuronas inmaduras (neuroblastos). La marcación contra DBC1 se realizó simplemente para monitorizar y confirmar la normal expresión de esa proteína en todas nuestras muestras. Simultáneamente, se acompañó la marcación de cada proteína, con una marcación nuclear con DAPI (Sigma-Aldrich, cat#D9542, marcador de ADN). Se tomaron microfotografías de diferentes zonas del giro dentado. Cada campo analizado fue fotografiado tanto en el canal de emisión para DAPI (ultravioleta) como en el canal correspondiente al pico de emisión de la fluoresceína, el fluorocromo ligado al anticuerpo secundario utilizado para evidenciar DBC1, Ki67 o DCX alternativamente. Es decir, que para cada campo se tomó una microfotografía con DAPI y otra con la marca que identifica DBC1, Ki67 o DCX, según corresponda. Las microfotografías fueron tomadas utilizando un objetivo 40x en un microscopio de epifluorescencia Olympus ix81 equipado con una cámara Hamamatsu ORCA ER cooled CCD, controlados mediante el software Micro Manager 1.4.22 (Institut Pasteur de Montevideo). Para el análisis se seleccionaron aleatoriamente 30 células en cada campo registrado correspondiente al canal del DAPI para luego contabilizar cuántos de aquellos núcleos marcados con DAPI son también positivos a Ki67. El estudio de la coincidencia de la señal en un canal con la señal en el otro, se realizó superponiendo las fotografías de la misma zona utilizando el software ImageJ. Considerando que la variable en estudio (presencia o ausencia de señal de ki67), se distribuye en forma binomial y asimétrica (muy pocas células positivas por campo), calculamos primeramente la probabilidad (p) de encontrar células positivas en el total de células granulares del campo, analizando aleatoriamente varios campos. Cada valor de " p " fue considerada una muestra representativa de la situación de ese individuo. Como asumimos (de acuerdo al Teorema del Limite Central) que los valores de " p " tomados de esta forma se distribuirán normalmente, comparamos controles contra KO utilizando un test de t .

Adicionalmente, se realizaron también experimentos de marcación con DCX por inmunohistoquímica en cortes incluidos en parafina. Si bien no utilizamos las imágenes obtenidas con fines cuantitativos, esta aproximación experimental resultó muy útil para tener una visión global de la distribución del antígeno en todo el territorio neuronal, algo que no pudimos apreciar claramente con la inmunofluorescencia. La marcación fue en base al uso de anticuerpos secundarios unidos a peroxidasa revelada mediante el uso de un sustrato cromogénico, la diaminobencidina (DAB) y anticuerpos unidos a peroxidasa, ambos reactivos contenidos en el kit comercial Betazoid DAB Chromogen Kit (cat.# BDB2004 H, L, MM), de Biocare-Medical.

De forma complementaria, un grupo de los cerebros fueron destinados a la realización de reconstrucciones volumétricas del giro dentado (objetivo específico 3). A todos ellos se los fijó con paraformaldehído (PFA) y se mantuvieron conservados en un recipiente con buffer fosfato. Al momento del procesamiento se los deshidrató con alcohol y se los incluyó en parafina mediante protocolo estandarizado y se le realizaron cortes coronales seriados de igual grosor de todo el sistema nervioso utilizando un micrótopo manual (Departamento de Patología de Facultad de Veterinaria). Una vez realizados los cortes, se tiñeron con azul de toluidina 1%, tinción sencilla que permitió la observación de los núcleos neuronales, en particular aquellos pertenecientes al giro dentado. Luego de teñidos se tomó registro fotográfico de todos los cortes utilizando un microscopio Nikon Eclipse 200 equipado con una cámara Micrometrics y un controlador Micrometrics SE Premium (Accu-Scope Inc). Las regiones de interés (ROIs) contenidas en las fotografías (contorno del giro dentado) fueron seleccionadas y exportadas al programa ImageJ donde se generó un stack ordenado de todas las ROIs en una única imagen. Utilizando el plug-in 3D del mismo paquete informático se calculó el volumen, la longitud y se generó una imagen volumétrica tridimensional de los giros dentados de los diferentes animales. Para las comparaciones entre tratamientos, utilizamos el test de Student.

RESULTADOS:

1- Caracterización de la expresión de DBC1 en el hipocampo de animales de diferentes edades.

Como punto de partida se realizó la caracterización de la expresión de DBC1 en tres regiones de importancia del sistema nervioso central como lo son cerebelo, corteza cerebral y giro dentado del hipocampo. Se confirmó su presencia en ellas y las características típicas de expresión como son su ubicación nuclear y su abundancia en estas tres zonas. Es de particular importancia para este trabajo observar la presencia y abundancia de DBC1 en el giro dentado del hipocampo murino (figura 13).

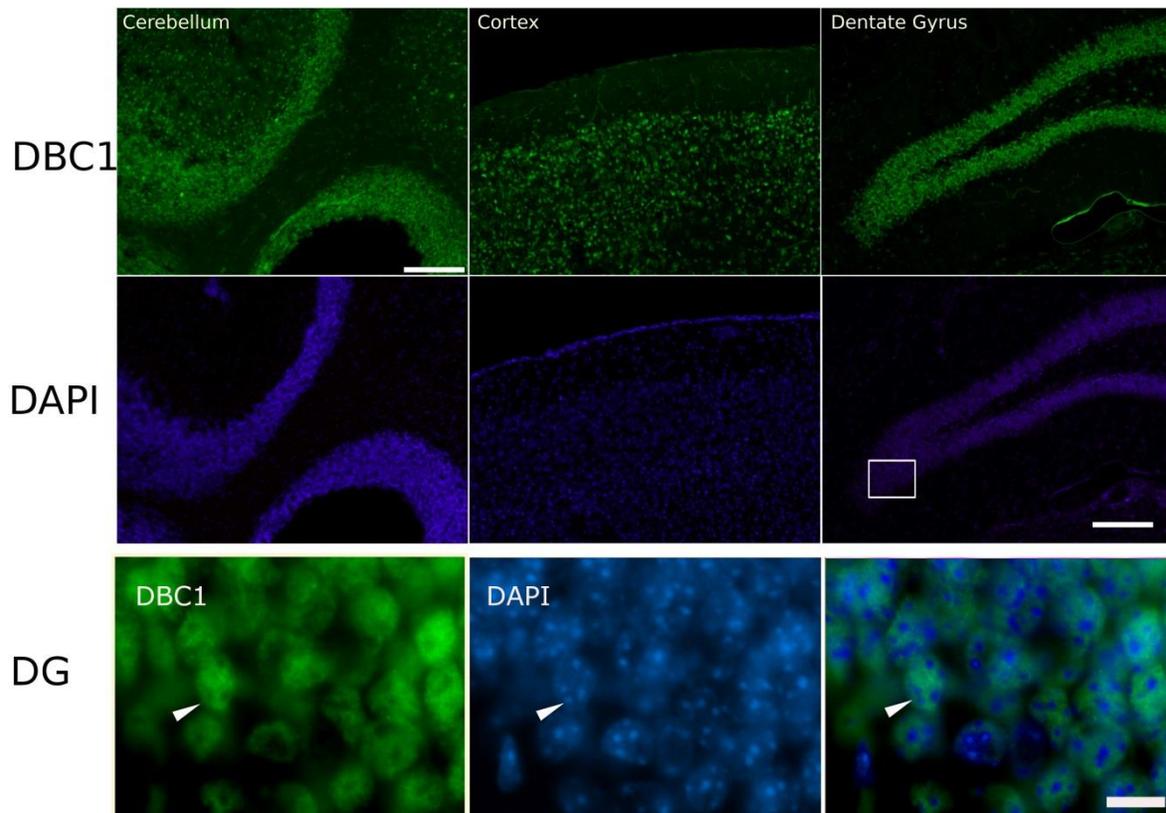


Fig. 13: Inmunofluorescencia mostrando el patrón de expresión de DBC1 (verde) en cerebelo (izquierda), corteza cerebral (centro) y giro dentado del hipocampo (derecha); barra, 200 micras. En la tercera fila se encuentra ampliada la región del giro dentado del hipocampo marcada en recuadro, visualizando su expresión de DBC1 (izquierda), DAPI (centro) y coinmunomarcación DAPI+DBC1 (derecha). Punta de flecha señala la marcación nuclear de DBC1, especial atención a la ausencia de marcación de DBC1 en nucléolo. Barra, 10micras. En la visualización comparada se puede establecer que DBC1 se ubica de forma muy abundante en las tres zonas.

Para la caracterización de la expresión de DBC1 a lo largo de la vida del individuo, elegimos 1 semana, 8 semanas, 30 semanas (aproximadamente 7 meses) y 105 semanas de vida como momentos representativos de diferentes etapas de la vida del animal; éstos representan el período post natal (1 semana), la adultez joven (8 semanas), la adultez media (30 semanas) y la senectud (105 semanas), respectivamente. Así, observamos que existe un momento de mayor expresión a la semana de edad y que se mantiene relativamente alto durante los primeros meses de vida para luego caer a niveles muy bajos. Este período de tiempo es particularmente interesante dado que por la bibliografía se sabe que en el ratón, durante la primer semana de vida, las tasas neurogénicas son particularmente altas a nivel del giro dentado para luego decaer manteniendo niveles relativamente altos hasta las 8 semanas, luego de la cual caen rápidamente. En ese sentido, la expresión de DBC1 se correlaciona aproximadamente con las tasas neurogénicas adultas a lo largo de la vida del individuo. De todas formas, la caída en la expresión de DBC1 tampoco parece constante, habiendo una variación importante luego de la semana de vida, un período de estabilidad relativamente largo y una nueva caída en animales envejecidos (figura 9).

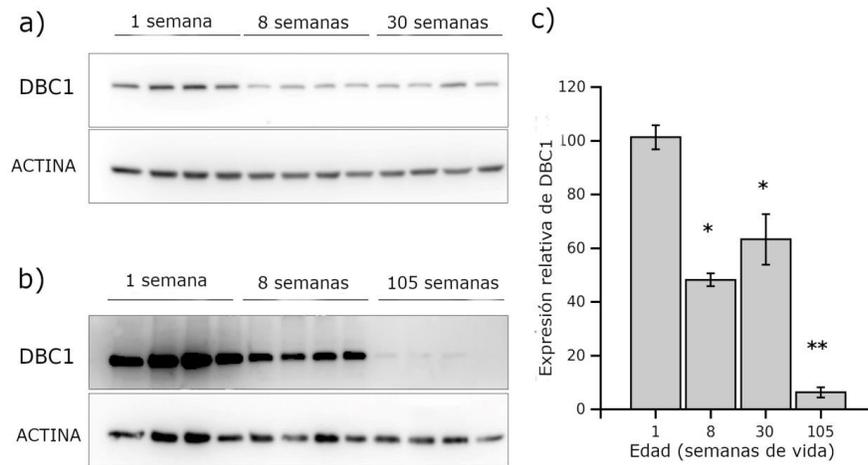


Fig. 14: Expresión de DBC1 a diferentes edades evaluadas por Western Blot. A; comparación entre animales de 1 semana, 8 semanas y 30 semanas de vida. B; Comparación entre animales de 1 semana, 8 semanas y 105 semanas de vida. La señal de los individuos de una semana fue sobre expuesta para poder comparar los niveles de expresión de los animales más viejos. C; Cuantificación de la expresión de DBC1 (como DBC1/actina) en animales de 1 semana, 8 semanas, 30 semanas y 105 semanas de vida. (*) p<0,05; (**) p<0,001 respecto a 1 semana.

2- Estudio de las tasas neurogénicas en el giro dentado de animales KO para DBC1 y sus controles.

Al realizar inmunofluorescencia de giro dentados del hipocampo con anticuerpos anti Ki67 (fig. 15) se observó que los animales KO para DBC1 presentan una menor proporción de células con núcleos positivos a Ki67 a nivel de la zona subgranular (tabla 1). Esta diferencia es muy sugestiva de mayores tasas proliferativas en la región de ambos grupos experimentales. Debido a la zona en la cual se da la marcación de células Ki67 positivas (zona subgranular del giro dentado) en donde se espera encontrar principalmente neuronas, y al mismo tiempo considerando las características morfológicas de las células marcadas, se podría sugerir que los cambios en la tasa de proliferación encontrados se pueden referir con un incremento en la tasa neurogénica. Sin embargo, considerando que Ki67 puede marcar precursores tanto del linaje neuronal como glial, no podemos hacer una extrapolación directa entre abundancia de células Ki67-positivas con actividad neurogénica propiamente dicha. Por lo tanto, para poder estudiar si existe una alteración a nivel de la actividad neurogénica debemos utilizar un marcador de neuroblastos como es DCX.

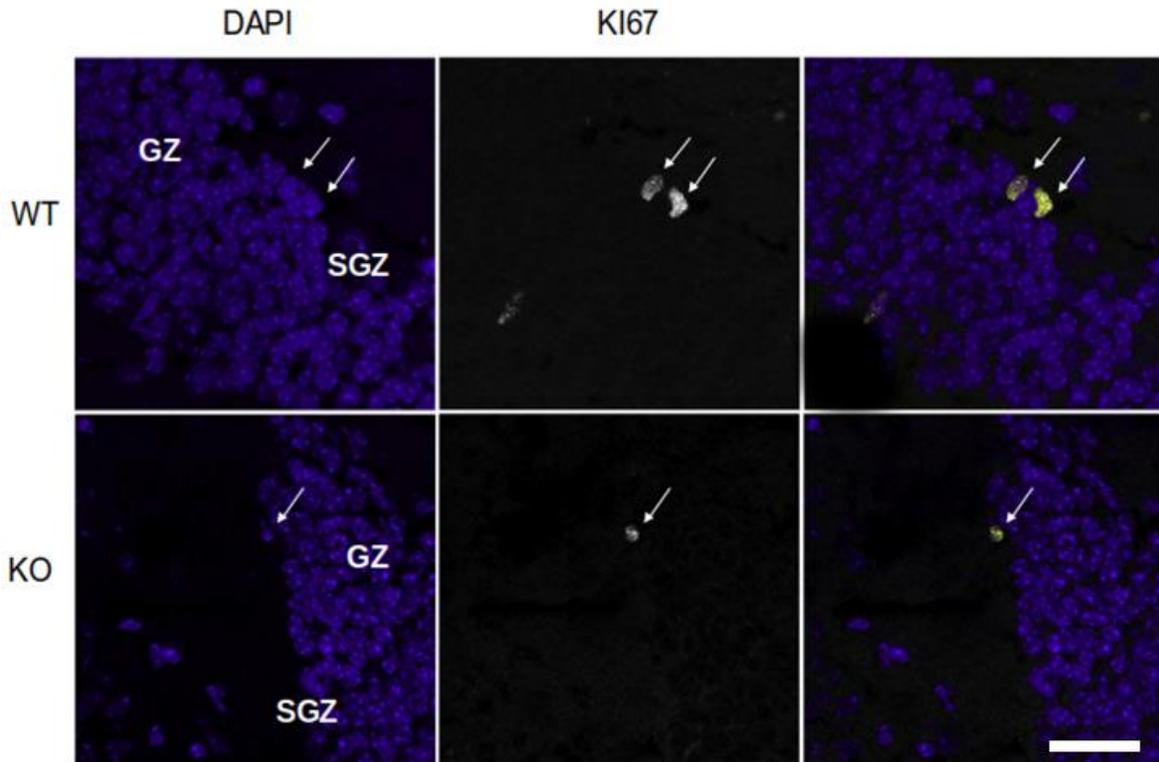


Fig. 15: Inmunofluorescencia en giro dentado de ratones de 8 semanas. En las microfotografías se puede observar una región del giro dentado del hipocampo de ratones WT y KO para DBC1. A la izquierda se marca con DAPI (canal azul) núcleos de neuronas. En la columna central se observa el mismo campo, pero ahora identificando estructuras Ki67 positivas (en blanco). Por último, en la columna derecha se observa la superposición de ambos canales, confirmando que la señal de Ki67 corresponde a núcleos de células ubicadas en la región sub granular. Barra, 50 micras.

	WT	KO
N+/Nt 1	3/140 (2,1%)	0/140 (0%)
N+/Nt 2	6/270 (2,2%)	1/300 (0,3%)
N+/Nt 3	8/610 (1,3%)	3/520 (0,5%)
N+/Nt 4	56/3739 (1,49%)	19/3164 (0,6%)
Media	1,43%*	0,30%*

Tabla 1. Cuantificación donde se mide la proporción de neuronas positivas a Ki67 en la zona subgranular del hipocampo de ratones de 8 semanas WT y KO para DBC1. N+, núcleos positivos; Nt, núcleos totales. *:P<0.02. n=4.

DCX es un marcador específico de neuroblastos, por lo cual de existir diferencias en las tasas neurogénicas, éstas deberían verse reflejadas en diferencias en la abundancia de células DCX-positivas o en términos más generales, de la expresión de DCX en el hipocampo. Detectamos células expresando DCX tanto en giros dentados de individuos controles, como de aquellos KO. Nótese que este anticuerpo define muy bien el árbol dendrítico pero no tan claramente el soma celular (figura 16A; flecha y cabeza de flecha, respectivamente), por lo cual una cuantificación de células positivas resulta dificultoso. Nótese además que la disposición de estas neuronas no es aleatoria, sino que sus somas aparecen ocupando en forma exclusivamente la región sub granular del giro dentado. Cuando el estudio morfológico se realiza por inmunofluorescencia (técnica que por sus características refleja más fielmente eventuales diferencias cuantitativas), apreciamos más marcación para DCX en animales controles (figura 16B).

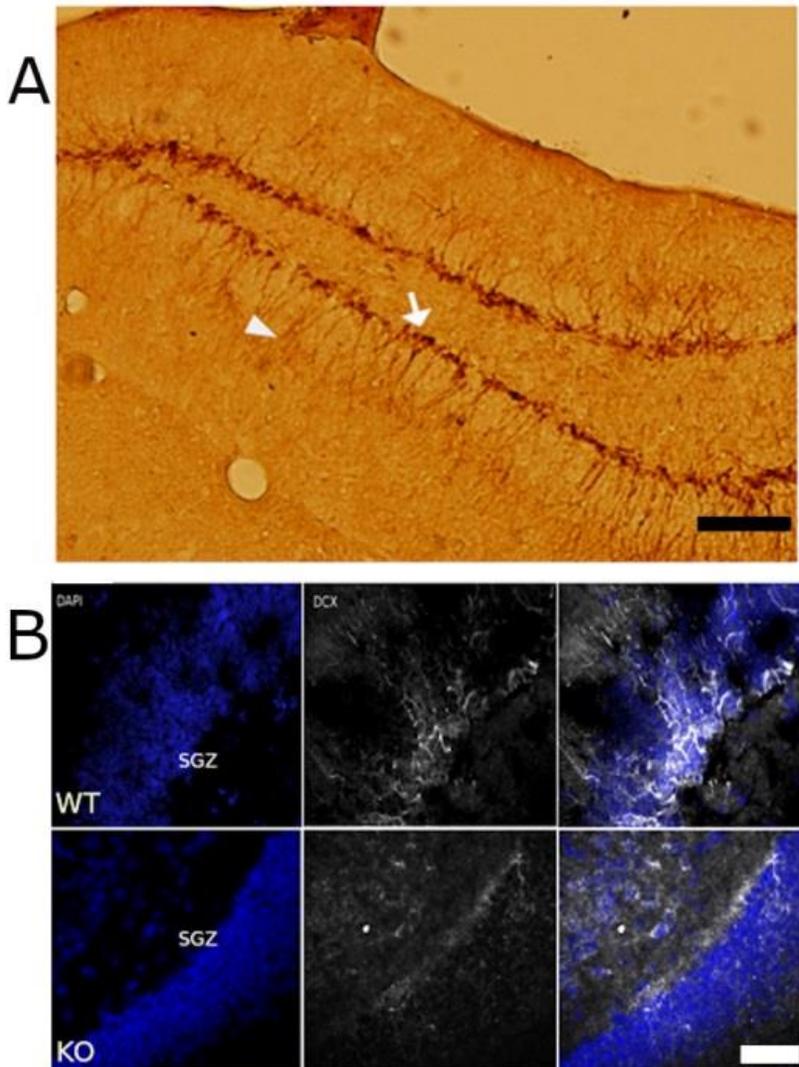


Fig. 16: A; Imagen panorámica del giro dentado de un animal WT de 8 semanas al cual se le realizó una inmunohistoquímica contra DCX. Se observa la marcación particularmente intensa en el soma (flecha) y las dendritas (cabezas de flecha) de neuronas inmaduras. Nótese la localización del soma preferentemente sobre la región sub granular y las proyecciones dendríticas hacia la granular y adentrándose en la molecular. Barra: 100micras B; Inmunofluorescencia de una región de la capa granular del giro dentado en animales WT y KO para DBC1 de 8 semanas. DAPI (canal azul), señala núcleos celulares; DCX (en blanco) que señala proyecciones de neuronas inmaduras. Se aprecia marcación más intensa en los animales controles. Barra: 200micras

El análisis de los niveles de DCX evidenciados mediante western blot (fig.17) demuestra diferencias significativas entre ambos grupos experimentales, siendo mayor en los controles. Este resultado va en la misma línea que lo sugerido por la expresión de Ki67.

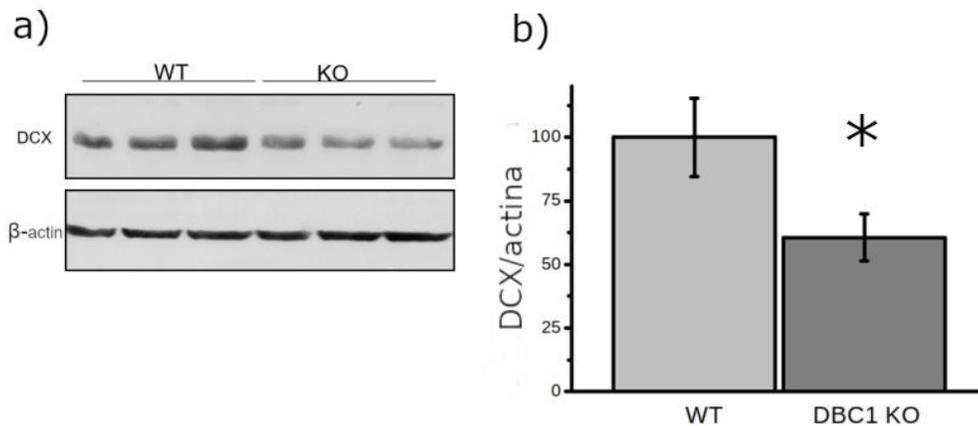


Fig. 17. Expresión de doblecortina en hipocampos de animales KO para DBC1 y controles de 8 semanas. A; Western Blot midiendo la expresión de DCX en animales WT y KO para DBC1 de 8 semanas de vida. B; Cuantificación de DCX (expresada en relación a la actina) en animales WT y KO para DBC1 de 8 semanas de vida. * $p < 0,05$.

3- La ausencia de DBC1 induce cambios morfológicos en el giro dentado.

La reconstrucción tridimensional de los giros dentados genera imágenes sugestivas de cambios morfológicos de dicha región del hipocampo. Las reconstrucciones de los diferentes giros dentados, permite distinguir en forma consistente una región anterior de volumen relativamente pequeño y una región más posterior con una proyección ventral más importante (figura 18A). Sin embargo, constatamos una variabilidad importante entre ellos en detalles más finos de la morfología como ser las contribuciones relativas de ambas zonas al largo total del núcleo y el grado de la proyección ventral de cada uno. Esto nos llevó a elegir como variable de comparación entre ellos, el parámetro más fácil de determinar que fue el largo del eje antero-posterior, que representa el largo del hipocampo. Se registraron y compararon los pesos de los cerebros a partir de los cuales se reconstruyeron los giros dentados, no encontrándose diferencias significativas entre ellos (figura 18B). Así, se decidió normalizar los valores de los ejes antero-posteriores respecto al peso de cada cerebro y de esta forma, poder hacerlos más fácilmente comparables. Se observaron diferencias significativas en los largos de los giros dentados en animales KO para DBC1 comparados con los animales WT, siendo los controles quienes tenían los ejes mayores (figura 18C). No se encontraron alteraciones microscópicas llamativas durante la observación de los cortes del giro dentado, encontrándose una capa granular de grosor aparentemente normal, presentando células de apariencia también normal.

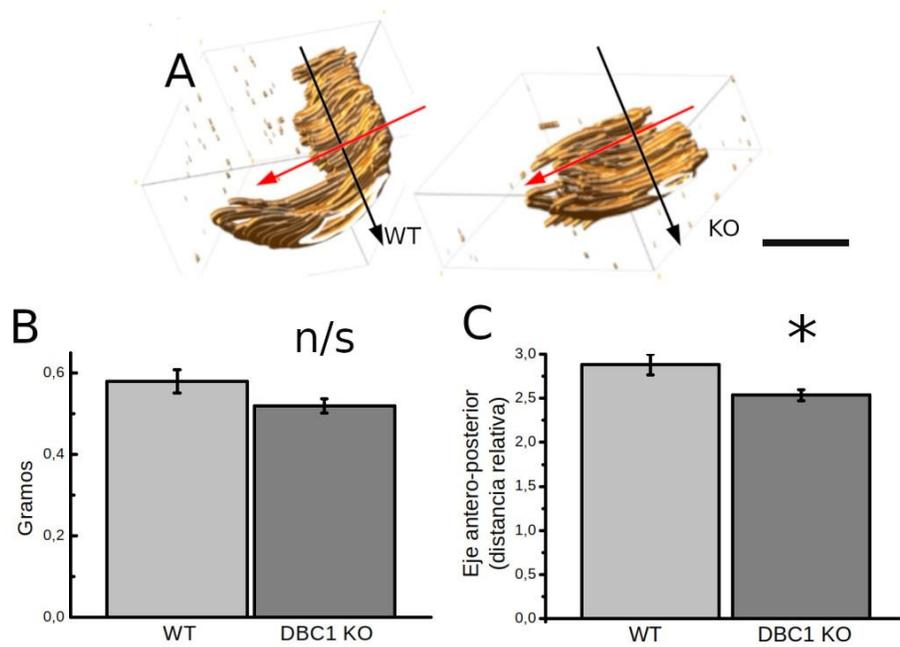


Fig. 18: Estudio morfológico del giro dentado del hipocampo en animales WT y KO para DBC1. A) Comparativa de reconstrucciones digitales tridimensionales de giros dentados de animales WT y KO para DBC1. Con flecha roja se representa el eje dorso-ventral mientras que con la flecha negra el eje antero-posterior. En este último es que se observa diferencias en longitud cuantificada en la fig. 15. Además se pueden observar las alteraciones morfológicas en la estructura general. Barra, 0.5 mm. B) Representación gráfica de las medias de los pesos de encéfalo (g) de animales WT y KO de 8 semanas de vida. No se observan diferencias significativas (n/s). El peso del encéfalo al mantenerse igual señala que no existen diferencias en los tamaños generales del encéfalo. C) Representación gráfica de la relación entre la longitud del eje antero posterior del giro dentado (μm) y peso del encéfalo (mg) en animales WT y KO de 8 semanas de vida. $p=0,034$.

DISCUSION:

Este trabajo se apoya en una serie de trabajos recientes que abordan el rol de DBC1 como parte de la regulación del ciclo celular de diferentes tipos celulares in vitro e in vivo, como son los hepatocitos (Santos et al., 2019) o adipocitos (Escande et al., 2015). Dentro de eso, el principal aporte es proponer a DBC1 como un posible regulador in vivo del ciclo celular en neuronas, específicamente vinculada a un proceso sumamente particular como es la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo. Esto por un lado aporta a seguir corroborando el rol de DBC1 como regulador del ciclo celular en general, poniendo a prueba la hipótesis en el sistema nervioso, sitio que permanecía inexplorado. Además el estudio del rol de DBC1 como regulador de la neurogénesis y/o diferenciación neuronal en el giro dentado del hipocampo permite avanzar en el conocimiento de esta proteína en particular pero también comprender más sobre los procesos que ocurren en el hipocampo posiblemente vinculados a la neurogénesis, como son el aprendizaje y la memoria. Estos procesos son de suma importancia por lo que conocer más sobre ellos y su funcionamiento en presencia o ausencia de DBC1 podría llegar a ser relevante incluso para entender que es lo que ocurre durante la vejez, las enfermedades o cualquier proceso que lleve a la afección de la neurogénesis o a la funcionalidad del hipocampo en general.

Luego de realizados los ensayos experimentales, consideramos que nuestra hipótesis basada en la bibliografía mencionada anteriormente, señalando el supuesto rol de DBC1 en la regulación del ciclo celular en diferentes tejidos y en particular en el hipocampo, se ha visto reforzada. Se ha arribado a esta conclusión a partir de los diferentes resultados que se han explicitado en el trabajo. Lo primero realizado fue la caracterización de la expresión de DBC1 a lo largo de la vida del individuo vinculando la misma con los diferentes niveles de neurogénesis adulta. La neurogénesis adulta en el ratón comienza con niveles muy altos en los primeros días de vida, considerándose esto como el final del proceso de neurogénesis fetal. Posterior a la semana de vida disminuye levemente para luego experimentar una abrupta caída aproximadamente a la semana 8-9 de vida en el ratón (Ansorg, Witte y Urbach, 2012), alcanzando niveles muy bajos que se mantendrán apenas detectables por el resto de la vida del individuo.

Para la realización del trabajo se tomaron diferentes edades representativas (1 semana, 8 semanas, 30 semanas y 105 semanas). Encontrándose que la expresión de DBC1 comienza a niveles altos a la semana de vida, disminuye para las 8 semanas, disminución que si bien existe se estabiliza y mantiene niveles relativamente altos hasta las 30 semanas de vida para luego desplomarse a niveles muy bajos a las 105 semanas de vida. El hecho que la expresión de DBC1 a lo largo de las diferentes edades realice una curva

semejante a la de la neurogénesis, sumada a su expresión particularmente abundante en uno de los focos de neurogénesis adulta (zona subgranular del giro dentado del hipocampo) y su vinculación a la regulación del ciclo celular en diferentes tejidos no confirma que DBC1 regule la neurogénesis o la diferenciación neuronal pero sí podemos afirmar que son muy sugestivos en cuanto a relacionar DBC1 con el proceso de neurogénesis y/o diferenciación neuronal en el giro dentado del hipocampo.

Es importante aclarar que cuando hacemos mención a DBC1 como posible reguladora del ciclo celular a nivel del giro dentado del hipocampo, dicha proteína podría actuar en dos niveles diferentes. La primera posibilidad sería que afecte al momento de la neurogénesis en sí misma y como consecuencia podría ocurrir que exista una menor tasa de reposición de células neurales progenitoras. Por otra parte, podría ocurrir lo que se está afectando fuera el proceso de diferenciación neuronal, siendo dicho proceso iniciado normalmente pero con pérdida de neuroblastos durante la diferenciación. Esto lleva a la generación de una menor proporción de neuronas adultas. Los resultados obtenidos en esta tesis, pueden explicarse por ambas posibilidades. Para aproximarnos más a poder determinar la presunta relación entre DBC1 y la neurogénesis y/o diferenciación neuronal se han realizado múltiples inmunofluorescencias y western blots con sus respectivas cuantificaciones. Estos procedimientos se hicieron utilizando dos marcadores (Ki67 y DCX). Ki67 es básicamente un marcador de proliferación celular, mientras que DCX corresponde a una proteína asociada a microtúbulos de neuronas inmaduras. Por eso, es importante aclarar que los Ki67 no señala células inmaduras que necesariamente se transformarían en neuronas adultas ya que también podrían marcar células que luego se diferencien en glías o en células que no lleguen a diferenciarse en neuronas maduras porque mueren por apoptosis. Sobre este punto consideramos que al marcar células en la capa granular y que dicha capa no presenta glías, se refuerza la presunción de que sí se estén marcando células inmaduras que se transformarían en neuronas adultas. Por otra parte, las marcaciones observadas en la capa polimórfica podrían ser células que luego se diferencien en glías.

Los resultados obtenidos en los experimentos mencionados anteriormente muestran que existe una disminución en la cantidad de células inmaduras reactivas a cualquiera de los dos marcadores utilizados en el giro dentado del hipocampo de animales KO para DBC1. La diferencia es notoria a la observación de las inmunofluorescencias en la zona subgranular del giro dentado. Esta diferencia se ha podido demostrar que es estadísticamente significativa mediante la cuantificación de las mismas. Para confirmar la disminución de células del linaje neural, también se realizó la medición de DCX mediante Western Blot.

Observándose resultados que señalan también una disminución en la proporción de DCX en los hipocampos de animales 8 semanas, KO para DBC1.

A futuro se propone continuar avanzando en los estudios para lograr determinar en qué momento de la vida celular es que interviene DBC1. Existiendo básicamente tres posibilidades: en la división de precursores, en la diferenciación neuronal o en ambas. Para ello se deberá realizar otros experimentos utilizando distintos marcadores que logren señalar lo antes mencionado. Un experimento que sería importante realizar con este propósito es la marcación con bromodesoxiuridina (BrdU) con diferente plazo entre la inyección del marcador y el sacrificio. Al BrdU ser un análogo de la timidina, este compuesto se incorpora a las células en división activa, es decir a precursores neurales. BrdU cuenta con la particularidad de que una vez incorporada a la célula permanece en ella de forma indefinida y solo desaparecerá la marcación si la célula deja de existir durante el proceso de diferenciación o luego. Con eso en cuenta, se pueden seleccionar dos momentos distintos de sacrificio: uno muy temprano (pocas horas post inyección) y otro más tardío (varias semanas después). Con el grupo sacrificado pocas horas post inyección se podrá obtener panorama de la actividad instantánea de generación de células de remplazo que está ocurriendo en el momento mismo de la inyección. Mientras que con el grupo sacrificado varias semanas después se podrá observar cuantas células de las que fueron marcadas al momento de inyección lograron culminar todo el proceso de diferenciación y alcanzaron a ser neuronas maduras, semanas más tarde. En este caso, para asegurarnos que las células BrdU positivas sean neuronas maduras (y no glías), se podría utilizar simultáneamente un marcador de neuronas diferenciadas como NeuN y cuantificar solo aquellas células con la doble marcación BrdU/NeuN. Ambos grupos deberán contar con animales WT y KO para DBC1 que permitan realizar la comparación. Si existe diferencia entre las poblaciones WT y KO en el grupo de los animales sacrificados pocas horas post inyección podríamos asegurar que la diferencia ocurre en las tasas mitóticas de progenitores neuronales. Por otra parte, si existe diferencia entre ambas poblaciones en el grupo de animales sacrificados varias semanas posteriores a la inyección podríamos decir que es el proceso de diferenciación neuronal quien realmente se ve afectado. Finalmente, otro aspecto importante a explorar es el mecanismo de regulación del ciclo celular que opera a través de DBC1. Si esta regulación es un efecto directo de DBC1 o es a través de una vía canónica, es un tema totalmente abierto. Por ejemplo, tanto p53 como BRCA1 son conocidos oncogenes cuya regulación está bajo control de SIRT1 (Li et al, 2014; Yi y Luo, 2010) y como se comentó SIRT1 está bajo el control de DBC1. Así la hipótesis de la participación de una vía regulatoria de este tipo, resulta altamente probable.

En suma, se han encontrado disminuida la expresión tanto de Ki67 como DCX en giros dentados de animales KO para DBC1 lo que puede ser interpretado como una disminución en la proporción de neuroblastos y que por ende se encuentra disminuida la neurogénesis y/o diferenciación neuronal. Lo anterior sugiere que DBC1 tiene un rol importante en el control del ciclo celular de las células del giro dentado del hipocampo. La función de DBC1 sería particularmente sensible ya que la zona afectada es una de las tan solo tres donde se produce el proceso de la neurogénesis adulta.

Ha sido reportado que la reducción experimental de la neurogénesis en el giro dentado, genera alteraciones estructurales en dicho núcleo nervioso (Ansorg et al., 2012) y considerando los resultados obtenidos en la inmunomarcación, nos propusimos confirmar si lo mismo estaría ocurriendo en nuestro modelo. Un resultado positivo en ese sentido, estaría reforzando la observación anterior y a su vez también nuestra hipótesis. Para ello, se realizó la construcción de réplicas digitales tridimensionales de los giros dentados de animales WT y KO para DBC1 utilizando el programa informático ImageJ. En dichas representaciones se encontraron diferencias significativas en la longitud del eje antero posterior de los giros dentados del hipocampo, donde los animales KO para DBC1 lo presentaban disminuido con respecto a los WT. Es importante mencionar que esta alteración morfológica es exclusiva de los giros dentados del hipocampo y no de los encéfalos totales donde sus pesos se mantienen.

Como se mencionó, el giro dentado del hipocampo es una zona particularmente sensible debido a ser un punto de neurogénesis adulta y estar vinculada con procesos de importancia como la memoria y el aprendizaje. Esto, sumado a que por bibliografía se conoce que las alteraciones estructurales traen como consecuencia afecciones cognitivas es que nos lleva a plantearnos la hipótesis de que la ausencia de DBC1 repercutirá en la disminución de la capacidad de aprendizaje de los ratones y su capacidad de memoria espacial. Para determinar si esto es así se podrían realizar distintos tipos de test comportamentales en animales WT y KO para DBC1. Algunos ejemplos posibles sería: La realización del test de Reconocimiento de objetos novedosos (Ennaceur y Delacour, 1988) donde podríamos determinar si existen diferencias cognitivas entre los dos tipos de animales específicamente, la formación y consolidación de nuevas memorias, lo cual requiere de la funcionalidad del hipocampo. Dicho test explora la tendencia que naturalmente tienen estos animales a la exploración de objetos novedosos. A medida que van pasando las sesiones de entrenamiento y el objeto se va tornando familiar, se espera que el tiempo dedicado a su exploración disminuya en relación a objetos novedosos que se le presenten. Un comportamiento diferente al esperado puede ser interpretado como una alteración

en la formación de memorias. Por otro lado, se podría evaluar la memoria espacial (también dependiente del hipocampo) mediante diferentes tests como por ejemplo el laberinto de Barnes (Barnes, 1979). Dicho laberinto consta de una plataforma circular elevada a 90cm de altura con 18 agujeros de 9 cm de diámetro separados por 20° de arco, donde uno permite el acceso a la denominada caja de salida. El ratón es colocado en el centro del laberinto y su instinto lo llevará a buscar la salida, en las sesiones siguientes se mide el tiempo que demoran en encontrar la salida y la cantidad de errores antes de encontrar la misma. Lo esperable sería que el tiempo vaya disminuyendo a lo largo de las sesiones al igual que la cantidad de errores.

Resumiendo, en el trabajo presentado se ha encontrado una correlación a lo largo de la edad entre la expresión de DBC1 y la neurogénesis. Se ha encontrado una disminución de neuronas inmaduras en animales KO para DBC1 medida de diversas formas. Por último, también se encontraron alteraciones morfológicas en el giro dentado del hipocampo de ratones KO para DBC1. Todos estos resultados llevan a proponer que DBC1 cumple un rol importante en el desarrollo de la neurogénesis y/o diferenciación neuronal adulta, Describir mejor el mecanismo y la relevancia fisiológica de esta modulación requerirá muchos y nuevos experimentos.

CONCLUSIONES:

Se determinó que la expresión de DBC1 en el hipocampo presenta variantes durante la vida del individuo coincidentemente con las variaciones en la neurogénesis adulta.

También se observaron diferencias significativas en la expresión de Ki67 y DCX entre animales WT y KO para DBC1. Ambos marcadores se encontraron disminuidos en su expresión en animales KO para DBC1, significando una disminución en la proporción de neuronas inmaduras y por ende de la neurogénesis y/o diferenciación neuronal en estos animales.

Por último, se comprobaron alteraciones morfológicas en giros dentados de hipocampo de animales KO para DBC1, específicamente una disminución en la longitud del eje antero posterior.

Resumiendo, encontramos que DBC1 cumple un rol importante en el sistema nervioso central, particularmente en el giro dentado del hipocampo, relacionado a la neurogénesis y/o diferenciación neuronal en la vida adulta.

BIBLIOGRAFIA:

- Aimone, J.B., Wiles, J., y Gage, F.H. (2006). Potential role for adult neurogenesis in the encoding of time in new memories. *Nature Neuroscience*, 9(6), 723-727.
- Altman, J. (1969). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *Journal of Comparative Neurology*, 137(4), 433-457.
- Altman, J. y Bayer, S. (1990). Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *Journal of Comparative Neurology*, 301(3), 365-381.
- Altman, J., y Das, G.D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *Journal of Comparative Neurology*, 124(3), 319-335.
- Amaral, D. (1978). A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 15, 851-914.
- Ambrogini, P., Lattanzi, D., Ciuffoli, S., Agostini, D., Bertini, L., Stocchi, V., ... y Cuppini, R. (2004). Morpho-functional characterization of neuronal cells at different stages of maturation in granule cell layer of adult rat dentate gyrus. *Brain Research*, 1017, 21-31.
- Ansorg, A., Witte, O.W., y Urbach, A. (2012). Age-dependent kinetics of dentate gyrus neurogenesis in the absence of cyclin D2. *BMC Neuroscience*, 13, 13-46.
- Araujo-Casagrande, M. (2017). *Consolidação sináptica da memória: descobrindo os parâmetros que modulam sua janela temporal* (Tesis de maestría). Universidad federal do Rio Grande Do Sul.
- Atkinson, R.C., y Shiffrin, R.M. (1968). Human memory: a proposed system and its control processes. The Psychology of Learning and Motivation. *Advances in Research and Theory*, 2, 89-195.
- Baddeley, A.D., y Warrington, E.K. (1970). Amnesia and the distinction between long- and short-term memory. *Journal of Verbal Learning and Verbal Behavior*, 9(2), 176-189.
- Baer, S., y Rinzel, J. (1991). Propagation of dendritic spikes mediated by excitable spines: a continuum theory. *Journal of Neurophysiology*, 65, 874-890.

- Baird, A.D., Wilson, S.J., Bladin, P.F., Saling, M.M. y Reutens, D.C (2007). Neurological control of human sexual behavior: insights from lesion studies. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 78(10), 1042–1049.
- Barnes, C.A. (1979). Memory deficits associated with senescence: A neurophysiological and behavioral study in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 93(1), 74–104.
- Bartsch, T., Döhring, J., Rohr, A., Jansen, O. y Deuschel, G. (2011). CA1 neurons in the human hippocampus are critical for autobiographical memory, mental time travel, and auto-noetic consciousness. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108 (42), 17562-17567.
- Bennet, M.V., Aljure, E. Nakajima, Y. y Pappas, G.D. (1963). Electrotonic junctions between teleost spinal neurons: electrophysiology and ultrastructure. *Science*, 141(3577), 262-264.
- Bennett, M.V. y Zukin, R.S. (2004). Electrical coupling and neuronal synchronization in the Mammalian brain. *Neuron*, 41(4), 495-511.
- Biebl, M., Cooper, C.M., Winkler, J. y Kuhn, H.G. (2000). Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neuroscience Letters*, 291(1), 17–20.
- Binder, M.D., Hirokawa, N. y Windhorst, U. (2009). *Encyclopedia of Neuroscience*. Berlin: Springer.
- Bliss, T.V., Burns, B.D. y Uttley, A.M. (1968). Factors affecting the conductivity of pathways in the cerebral cortex. *The Journal of Physiology*, 195(2), 339-367.
- Bonaguidi, M.A., Song, J., Ming, G. y Song, H. (2012). A unifying hypothesis on mammalian neural stem cell properties in the adult hippocampus. *Current Opinion in Neurobiology*, 22(5), 754 – 761.
- Brandt, M.D., Jessberger, S., Steiner, B., Kronenberg, G., Reuter, K., Bick-Sander, A., ... y Kempermann, G. (2003). Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 24(3), 603 – 613.
- Burnham, W.H. (1903). Retroactive amnesia: Illustrative cases and a tentative explanation. *The American Journal of Psychology*, 14(3-4), 382–396.

- Calliari, A., Bobba, N., Escande, C. y Chini, E.N. (2014). Resveratrol delays Wallerian degeneration in a NAD⁺ and DBC1 dependent manner. *Experimental Neurology*, 251, 91–100.
- Cameron, H. y McKay, R. (2001). Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *The Journal of Comparative Neurology*, 435(4), 406-417.
- Chancey, J.H., Adlaf, E.W., Sapp, M.C., Pugh, P.C., Wadiche, J.I. y Overstreet-Wadiche, L.S. (2013). GABA depolarization is required for experience-dependent synapse unsilencing in adult-born neurons. *The Journal of Neuroscience*, 33(15), 6614–6622.
- Cherniak, C., Changizi, M. y Kang, D. (1999). Large-scale optimization of neuron arbors. *Physical Review E, Statical Physics, Plasmas, Fluids and related interdisciplinary topics*, 59(5pt.B), 6001-6009.
- Chini, C., Escande, C., Nin, V. y Chini, E.N. (2012). HDAC3 is negatively regulated by the nuclear protein DBC1. *Journal of Biological Chemistry*, 285(52), 40830–40837.
- Chini, E.N., Chini, C., Nin, V. y Escande, C. (2013). Deleted in Breast cancer-1 in the interface between metabolism, aging and cancer. *Bioscience Reports*, 33(4), e00058.
- Claiborne B.J., Amaral, D.G. y Cowan, W.M. (1990). Quantitative, three-dimensional analysis of granule cell dendrites in the rat dentate gyrus. *The Journal of comparative neurology*, 302(2), 206-219.
- Collins A. y Koechlin E., (2012). Reasoning, Learning, and Creativity: Frontal Lobe Function and Human Decision-Making. *PLoS Biology*, 10(3), e1001293.
- Colman, L., Caggiani, M., Leyva, A., Bresque, M., Liechocki, S., Maya-Monteiro, C.M.,... y Escande, C. (2020). The protein Deleted in Breast Cancer-1 (DBC1) regulates vascular response and formation of aortic dissection during Angiotensin II infusion. *Scientific reports*, 10, 6772.
- Corpas, R., Revilla, S., Ursulet, S., Castro-Freire, M., Kaliman, P., Petegnief, V., ... y Sanfeliu, C. (2016). SIRT1 overexpression in mouse hippocampus induces cognitive enhancement through proteostatic and neurotrophic mechanisms. *Molecular Neurobiology*, 54(7), 5604-5619.
- De Leonibus, E., Oliverio, A. y Mele, A. (2005). A study on the role of the dorsal striatum and the nucleus accumbens in allocentric and egocentric spatial

- memory consolidation. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 12(5), 491–503.
- Debanne, D. (2004). Information processing in the axon. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(4), 304-316.
- Ding, X., Jo, J., Wang, C.Y., Cristobal, C.D., Zuo, Z., Ye, Q., ... y Lee, H.K. (2020). *Genes & Development*, 34, 1177-1189.
- Dudai, Y. y Morris, R.G.M. (2013). Memorable trends. *Neuron*. 80(3), 742-750.
- Dupret, D., Revest, J., Koehl, M., Ichas, F., De Giorgi, F., Costet, P., ... y Piazza, P.V. (2008). Spatial Relational Memory Requires Hippocampal Adult Neurogenesis. *PLoS One*, 3(4), e1959.
- Elias, L.J. y Saucier, D.M., (2006). *Neuropsychology: Clinical and Experimental Foundations*. Boston: Pearson.
- Ennaceur, A. y Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural Brain Research*, 31(1), 47–59.
- Escande, C., Chini, C., Nin, V., Dykhouse, K.M., Novak, C.M., Levine, J., ... y Chini, E.N. (2010). Deleted in breast cancer-1 regulates SIRT1 activity and contributes to high-fat diet-induced liver steatosis in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(2), 545–558.
- Escande, C., Nin, V., Pirtskhalava, T., Chini, C., Barbosa, M.T., Mathison, A., ... y Chini, E.N. (2013). Deleted in Breast Cancer 1 regulates cellular senescence during obesity. *Aging Cell*, 13(5), 951–953.
- Escande, C., Nin, V., Pirtskhalava, T., Chini, C., Tchkonja, T., Kirkland, J.L. y Chini, E.N. (2015). Deleted in breast cancer 1 limits adipose tissue fat accumulation and plays a key role in the development of metabolic syndrome phenotype. *Diabetes*, 64(1), 12–22.
- Espósito, M.S., Piatti, V.C., Laplagne, D.A., Morgenstern, N.A., Ferrari, C.C., Pitossi, F.J. y Schinder, A.F. (2005). Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *The Journal of Neuroscience: The official journal of the society for neuroscience*, 25(44), 10074–10086.
- Fabel, K. y Kempermann, G. (2008). Physical activity and the regulation of neurogenesis in the adult and aging brain. *Neuromolecular Medicine*, 10(2), 59-66.

- Faulkner, R.L., Jang, M.H., Liu, X.B., Duan, X., Sailor, K.A., Kim, J.Y., ... y Cheng, H.J. (2008). Development of hippocampal mossy fiber synaptic outputs by new neurons in the adult brain. *Proceedings of the National Academy of sciences of the United States of America*, 105(37), 14157–14162.
- Favuzzi, E. y Rico, B. (2018). Molecular diversity underlying cortical excitatory and inhibitory synapse development. *Current Opinion in Neurobiology*, 53, 8-15.
- Feng, T.P. (1940). Studies on the neuromuscular junction. XVIII. The local potentials around n-m junctions induced by single and multiple volleys. *Chinese Journal of Physiology*, 15, 367-404.
- Förster, E., Zhao, S. y Frotscher, M. (2006). Laminating the hippocampus. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(4):259-67.
- Franklin, K. y Paxinos, G. (2008). *The mouse brain in stereotaxic coordinates* (3rd ed.). Cambridge: Academic Press.
- Frodl, T., Jäger, M., Smajstrlova, I., Born, C., Bottlender, R., Palladino, T., ... y Meisenzahl, E.M. (2008). Effect of hippocampal and amygdala volumes on clinical outcomes in major depression: a 3-year prospective magnetic resonance imaging study. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 33(5), 423- 430.
- Gaarskjaer F. B. 1978, Organization of the mossy fiber system of the rat studied in extended hippocampi. II. Experimental analysis of fiber distribution with silver impregnation methods. *The journal of comparative neurology*, 178(1), 73-88.
- Galizia, C. y Lledo, P. (2013). *Neurosciences - From Molecule to Behavior*, Berlin: Springer Heidelberg.
- Ganz, J. y Brand, M. (2016). Adult Neurogenesis in Fish. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1;8(7), a019018.
- Ge, S., Goh, E.L., Sailor, K.A., Kitabatake, Y., Ming, G.L. y Song, H. (2006). GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature*, 439(7076), 589–593.
- Goldman-Rakic, P.S. (1995). Cellular basis of working memory. *Neuron*, 14(3), 477-485.
- Gould, E., Tanapat, P., McEwen, B.S., Flügge, G. y Fuchs, E. (1998). Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is

diminished by stress. *Proceedings of the National Academy of sciences of the United States of America*, 95(6), 3168-3171.

Grandel, H. y Brand, M. (2012). Comparative aspects of adult neural stem cell activity in vertebrates. *Development Genes and Evolution*, 223(1-2), 131–147.

Greenberg, R.W., Lane, E.L., Cinnamon, J., Farmer, P. y Hyman, R.A. (1994). The cranial meninges: anatomic considerations. *Seminars in Ultrasound, CT and MR*, 15(6), 454-465.

Hamaguchi, M., Meth, J.L., Von Klitzing, C., Wei, W., Esposito, D., Rodgers, L., ... y Wigler, M.H. (2002). DBC1, a candidate for a tumor suppressor gene involved in breast cancer. *Proceedings of the National Academy of sciences of the United States of America*, 99(21), 13647–13652.

Han, Z., Buhl, E.H., Lörinczi, Z. y Somogyi, P. (1993). A High Degree of Spatial Selectivity in the Axonal and Dendritic Domains of Physiologically Identified Local-circuit Neurons in the Dentate Gyms of the Rat Hippocampus. *The European journal of neuroscience*, 5(5), 395-410.

Harris, E.W., Ganong, A.H. y Cotman, C.W. (1984). LTP in the hippocampus involves activation of NMDA receptors. *Brain Research*, 323(1), 132–137.

Hastings, N.B. y Gould, E. (1999). Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells. *The Journal of Comparative Neurology*, 413(1), 146-154.

Hayakawa, T., Iwai, M., Aoki, S., Takimoto, K., Maruyama, M., Maruyama, W. y Motoyama, N. (2015). SIRT1 suppresses the senescence-associated secretory phenotype through epigenetic gene regulation. *PloS one*, 10(1), e0116480.

Hodge, R.D., Kowalczyk, T.D., Wolf, S.A., Encinas, J.M., Rippey, C., Enikolopov, G. y Hevner, R.F. (2008). Intermediate progenitors in adult hippocampal neurogenesis: Tbr2 expression and coordinate regulation of neuronal output. *The Journal of Neuroscience: The official journal of the society for neuroscience*, 28(14), 3707–3717.

Hodgkin, A.L. y Huxley, A.F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of physiology*, 117(4), 500–544.

- Hoffmann, M. (2013). The human frontal lobes and frontal network systems: an evolutionary, clinical, and treatment perspective. *ISRN neurology*, 892459.
- Honkura, N., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Ellis-Davis, G.C. y Kasai, H. (2008). The subspine organization of actin fibers regulates the structure and plasticity of dendritic spines. *Neuron*, 57(5), 719–729.
- Hotulainen, P. y Hoogenraad, C.C. (2010). Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *The Journal of Cell Biology*, 189(4), 619–629.
- Jessberger, S. y Kempermann, G. (2003). Adult-born hippocampal neurons mature into activity-dependent responsiveness. *European Journal of Neuroscience*, 18(10), 2707-2712.
- Li, D., Bi, F.F., Chen, N.N., Cao, J.M., Sun, W.P., Zhou, Y.M., ... y Yang, Q. (2014). A novel crosstalk between BRCA1 and sirtuin 1 in ovarian cancer. *Scientific reports* 4, 6666.
- Joshi, P., Quach, O.L., Giguere, S.S.B. y Cristea, M. (2013). A Functional Proteomics Perspective of DBC1 as a Regulator of Transcription. *Journal of Proteomics and Bioinformatics*, Suppl 2, 002.
- Kaas, J.H. y Hackett, T.A. (1999). 'What' and 'where' processing in auditory cortex. *Nature Neuroscience*, 2(12), 1045–1047.
- Kandel, E.R., Dudai, Y. y Mayford, M.R. (2014). The molecular and systems biology of memory. *Cell*, 157(1), 163-86.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H. y Jessel, T.M. (2000). *Principles of neural science* (4^{ed}). New York: McGraw-Hill.
- Kanwisher, N., McDermott, J. y Chun, M.M. (1997). The fusiform face area: A module in human extrastriate cortex specialized for face perception. *The Journal of Neuroscience: The official journal of the society for neuroscience*, 17(11), 4302–4311.
- Karalay, O., Doberauer, K., Vadodaria, K.C., Knobloch, M., Berti, L., Miquelajauregui, A., ... y Jessberger, S. (2011). Prospero-related homeobox 1 gene (Prox1) is regulated by canonical Wnt signaling and has a stagespecific role in adult hippocampal neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(14), 5807–5812.
- Katz, B. (1967). *Nerve, Muscle, and synapse*. New York: McGraw-Hill.

- Kempermann, G. (2015). Adult Neurogenesis: An Evolutionary Perspective. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 18, 8(2), a018986.
- Kempermann, G., Gast, D., Kronenberg, G., Yamaguchi, M. y Gage, F.H. (2003). Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development (Cambridge, England)*, 130(2), 391–399.
- Kepecs, A. y Fishell, G. (2014). Interneuron cell types are fit to function. *Nature*, 505(7483), 318–326.
- Kettenmann, H. Ransom, B. (2005). *Neuroglia*. (2^aed). New York: Oxford University Press.
- Kiernan J. A. (2012). Anatomy of the Temporal Lobe. *Epilepsy research and treatment*, 2012, 176157.
- Kim, J.E., Chen, J. y Lou, Z. (2008). DBC1 is a negative regulator of SIRT1. *Nature*, 451(7178), 583-586.
- Kirischuk, S., Kettenmann, H. y Verkhratsky, A. (2007). Membrane currents and cytoplasmic sodium transients generated by glutamate transport in Bergmann glial cells. *Pflugers archive: European Journal of Physiology*, 454(2), 245–252.
- Konig, H. y Liebich, H. (2005). *Anatomía de los animales domésticos: texto y atlas a color*. Madrid: Medica Panamericana.
- Laplagne, D., Kamienkowski, J.E., Esposito, M.S., Piatti, V.C., Zhao, C., Gage, F.H. y Schinder, A.F. (2007). Similar GABAergic inputs in dentate granule cells born during embryonic and adult neurogenesis. *European journal of Neuroscience*, 25(10), 2973-2981.
- Laurberg, S. y Sørensen K. (1981). Associational and commissural collaterals of neurons in the hippocampal formation (hilus fasciae dentatae and subfield CA3). *Brain Research*, 212(2), 287-300.
- Li, Y., Stam, F.J., Aimone, J.B., Goulding, M., Callaway, E.M. y Gage, F.H. (2013). Molecular layer perforant path-associated cells contribute to feed-forward inhibition in the adult dentate gyrus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(22), 9106–9111.

- Libert, S., Pointer, K., Bell, E.L., Das, A., Cohen, D.E., Asara, J.M., ... y Guarente, L. (2011). SIRT1 activates MAO-A in the brain to mediate anxiety and exploratory drive. *Cell*, 147(7), 1459–1472.
- Lledo, P.M., Alonso, M. y Grubb, M.S. (2006). Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nature Reviews. Neuroscience*, 7(3), 179-193.
- Ludwig P.E., Reddy V. y Varacallo M. (2017). *Neuroanatomy, Central Nervous System (CNS)*. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK442010/>
- Lundqvist, M., Rose, J., Herman, P., Brincat, S.L., Buschman, T.J. y Miller, E.K. (2016). Gamma and Beta Bursts Underlie Working Memory. *Neuron*, 90(1), 152-164.
- Mackie, G.O. (1990). The Elementary Nervous System Revisited. *American zoologist*, 30(4), 907-920.
- Major, G. y Tank, D. (2004). Persistent neural activity: prevalence and mechanisms. *Current Opinion in Neurobiology*, 14(6), 675-684.
- Mongiati L.A. y Schinder A.F. (2011). Adult neurogenesis and the plasticity of the dentate gyrus network. *The European Journal of Neuroscience*, 33(6), 1055-1061.
- Morris, R.G., Garrud, P., Rawlins, J.N. y O'Keefe, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*, 297(5868), 681-683.
- Muller, D., Joly, M. y Lynch, G. (1988). Contributions of quisqualate and NMDA receptors to the induction and expression of LTP. *Science*, 242(4886), 1694-1697.
- Muramatsu, R., Ikegaya, Y., Matsuki, N y Koyama, R. (2007). Neonatally born granule cells numerically dominate adult mice dentate gyrus. *Neuroscience*, 148(3), 593–598.
- Murray E.A. y Mishkin, M. (1983). Several tactual memory deficits in monkeys after combined removal of the amygdala and hippocampus. *Brain Research*, 270(2), 340-344.
- Noble, M., Murray, K., Stroobant, K., Waterfield, M.D. y Riddle, P. (1988). Platelet-derived growth factor promotes division and motility and inhibits premature differentiation of oligodendrocyte-type-2 astrocyte progenitor cells. *Nature*, 333, 560–562.

- Nottebohm, F. (2004). The road we travelled: Discovery, choreography, and significance of brain replaceable neurons. *Annals of the New York Academy of Science*, 1016, 628–658.
- Palmer, T.D., Ray, J. y Gage, F.H. (1995). FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 6(5), 474 – 486.
- Palmer, T.D., Takahashi, J. y Gage, F.H. (1997). The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 8(6), 389–404.
- Pantin C.F. (1956). Comparative physiology of muscle. *British Medical Bulletin*, 12(3), 199–202.
- Pereda, A. (2014). Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses. *Nature Reviews Neuroscience*, 15, 250–263.
- Phillips, R.G. y LeDoux, J.E. (1992). Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behavioral Neuroscience*, 106(2), 274-285.
- Piatti, V., Davies-Sala, M.G., Esposito, M.S., Mongiat, L.A., Trincherro, M.F. y Schinder, A.F. (2011). The timing for neuronal maturation in the adult hippocampus is modulated by local network activity. *The Journal of Neuroscience: The official journal of the society for neuroscience*, 31(21), 7715–7728.
- Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Hall, W.C., LaMantia, A.S., McNamara, J.O. y Williams, S.M. (2008). *Neuroscience* (4^a Ed.). Sunderland: Sinauer Associates.
- Ramirez-Amaya, V., Marrone, D.F., Gage, F.H., Worley, P.F. y Barnes, C.A. (2006). Integration of new neurons into functional neural networks. *The Journal of Neuroscience: The official journal of the society for neuroscience*, 26(47), 12237-12241.
- Ramon y Cajal, S. (1911). *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés*. Paris: Maloine.
- Ramon y Cajal, S. (1933). *Histology*. Baltimore: Wood.
- Ray, J., Peterson, D.A., Schinstine, M. y Gage, F.H. (1993). Proliferation, differentiation, and long-term culture of primary hippocampal neurons.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America, 90(8), 3602–3606.

- Ribak, C.E. y Seress, L. (1983). Five types of basket cell in the hippocampal dentate gyrus: a combined Golgi and electron microscopic study. *Journal of Neurocytology*, 12(4), 577–597.
- Santos, L., Colman, L., Contreras, P., Chini, C., Carlomagno, A., Leyva, A., ... y Escande, C. (2019). A novel form of Deleted in breast cancer 1 (DBC1) lacking the N-terminal domain does not bind SIRT1 and is dynamically regulated in vivo. *Scientific Reports*, 9, 14381.
- Sathian, K. (2016). Analysis of haptic information in the cerebral cortex. *Journal of neurophysiology*, 116(4), 1795–1806.
- Schaffer, K. (1892). Beitrag zur histologie der ammonshornformation (Contribution to the histology of the Cornu Ammonis). *Archiv für mikroskopische anatomie*, 39, 611-632.
- Scharfman, H.E. (1995). Electrophysiological evidence that dentate hilar mossy cells are excitatory and innervate both granule cells and interneurons. *Journal of Neurophysiology*, 74(1), 179-194.
- Scoville, W.B. y Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 20(1), 11-21.
- Segev, I. y Schneidman, E.J. (1999). Axons as computing devices: basic insights gained from models. *Journal of Physiology Paris*, 93(4), 263-270.
- Seress, L. y Pokorny, J. (1981). Structure of the granular layer of the rat dentate gyrus. A light microscopic and Golgi study. *Journal of anatomy*, 133(Pt. 2), 181–195.
- Sheline, Y.I., Wang, P.W., Gado, M.H., Csernansky, J.G. y Vannier, M.W. (1996). Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America*, 93(9), 3908-3913.
- Sheng, M. y Hoogenraad, C.C., (2007). The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annual Review of Biochemistry*, 76, 823–847.
- Sherwood, L. (2015). *Human Physiology: From Cells to Systems*. Boston: Cengage Learning.

- Shi, Y., Chinchung-Lie, D., Taupin, P., Nakashima, K., Ray, J., Yu, R.T., ... y Evans, R.M. (2004). Expression and function of orphan nuclear receptor TLX in adult neural stem cells. *Nature*, 427(6969), 78–83.
- Sik, A., Penttonen, M. y Buzsaki, G. (1997). Interneurons in the Hippocampal Dentate Gyrus: an In Vivo intracellular Study. *The European Journal of Neuroscience*, 9(3), 573-588.
- Soltesz, I. y Losonczy, A. (2018). CA1 pyramidal cell diversity enabling parallel information processing in the hippocampus. *Nature Neuroscience*, 21(4), 484–493.
- Song, J., Zhong, C., Bonaguidi, M.A., Sun, G.J., Hsu, D., Gu, Y., ... y Song, H. (2012). Neuronal circuitry mechanism regulating adult quiescent neural stem-cell fate decision. *Nature*, 489(7414), 150 –154.
- Soriano, E. y Frotscher, M. (1989). A GABAergic axo-axonic cell in the fascia dentata controls the main excitatory hippocampal pathway. *Brain Research*, 503(1), 170-174.
- Soriano, E. y Frotscher, M. (1994). Mossy cells of the rat fascia dentata are glutamate-immunoreactive. *Hippocampus*, 4(1), 65-69.
- Squire, L.R., Clark, R.E. y Knowlton, B.J. (2001). Retrograde amnesia. *Hippocampus*, 11(1), 50-55.
- Squire, L.R., Genzel, L., Wixted, J.T. y Morris, R.G. (2015). Memory consolidation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(8), a021766.
- Star, E.N., Kwiatkowski, D.J. y Murthy, V.N. (2002). Rapid turnover of actin in dendritic spines and its regulation by activity. *Nature Neuroscience*, 5(3), 239–246.
- Steiner, B., Klempin, F., Wang, L., Kott, M., Kettenmann, H, y Kempermann, G. (2006). Type-2 cells as link between glial and neuronal lineage in adult hippocampal neurogenesis. *Glia*, 54(8), 805–814.
- Stuart, G., Spruston, N., Sakmann, B. y Häusser, M. (1997). Action potential initiation and backpropagation in neurons of the mammalian CNS. *Trends in Neurosciences*, 20(3), 125-131.
- Stuss, D. y Knight, R. (2013). *Principles of frontal lobe function*. New York: Oxford University Press.

- Sun, G.J., Sailor, K.A., Mahmood, Q.A., Chavali, N., Christian, K.M., Song, H. y Ming, G.L. (2013). Seamless reconstruction of intact adult-born neurons by serial end-block imaging reveals complex axonal guidance and development in the adult hippocampus. *The Journal of Neuroscience: The official journal of the society for neuroscience*, 33(28), 11400–14011.
- Tashiro, A., Makino, H. y Gage, F.H. (2007). Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: a critical period during an immature stage. *The Journal of Neuroscience: The official journal of the society for neuroscience*, 27(12), 3252–3259.
- Tonegawa, S., Pignatelli, M., Roy, D.S., Ryan, T.J. (2015). Memory engram storage and retrieval. *Current opinion in Neurobiology*, 35, 101-109.
- Toni, N., Laplagne, D.A., Zhao, C., Lombardi, G., Ribak, C.E., Gage, F.H. y Schinder, A.F. (2008). Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nature Neuroscience*, 11(8), 901–907.
- Toni, N., Teng, E.M., Bushong, E.A., Aimone, J.B., Zhao, C., Consiglio, A., ... y Gage, F.H. (2007). Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus. *Nature Neuroscience*, 10(6), 727–734.
- Tozuka, Y., Fukuda, S., Namba, T., Seki, T. y Hisatsune, T. (2005). GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron*, 47(6), 803–815.
- Tsien, J.Z., Huerta P. y Tonegawa, S. (1996). The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell*, 87(7), 1327-1338.
- Tzakis, N. y Holahan, M.R. (2019). Social Memory and the Role of the Hippocampal CA2 Region. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 13, 233.
- Van Hoesen, G.W. y Pandya, D.N. (1975). Some connections of the entorhinal (area 28) and perirhinal (area 35) cortices in the rhesus monkey. *Brain Research*, 95(1), 1-24.
- Van Praag, H., Shubert, T., Zhao, C. y Gage, F.H. (2005). Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *The Journal of Neuroscience: The official journal of the society for neuroscience*, 25(38), 8680-8685.

- Vandenbranden C.A.V., Verweij, J., Kamermans, M., Müller, L.J., Ruijter, J.M., Vrensen, G.F.J.M. y Spekrijse, H. (1996). Clearance of neurotransmitter from the cone synaptic cleft in goldfish retina. *Vision Research*, 36(24), 3859-3874.
- Varela, R. (2016). *Caracterización topográfica y temporal de la expresión de la proteína DBC1 en el sistema nervioso central del ratón* (Tesis de grado). Facultad de Ciencias, UdelaR, Montevideo.
- Von Bohlen Und Halbach, O. (2007). Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell and Tissue Research*, 329(3), 409-420.
- Wang, S., Scott, B.W. y Wojtowicz, J.M. (2000). Heterogenous properties of dentate granule neurons in the adult rat. *Journal of Neurobiology*, 42(2), 248–257.
- Wiskott, L., Rasch, M.J. y Kempermann, G. (2006). A functional hypothesis for adult hippocampal neurogenesis: Avoidance of catastrophic interference in the dentate gyrus. *Hippocampus*, 16(3), 329–343.
- Witter, M.P., Gronewegen, H.J., Lopes Da Silva, F.H. y Lohman, A.H. (1989). Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region. *Progress in Neurobiology*, 33(3), 161-253.
- Yang, Y. y Wang J.Z. (2017). From Structure to Behavior in Basolateral Amygdala-Hippocampus Circuits. *Frontiers in Neural Circuits*, 11, 86.
- Yi, J. y Luo, J. (2010). SIRT1 and p53, effect on cancer, senescence and beyond. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804(8), 1684-1689.
- Zhao, C., Deng, W. y Gage, F.H. (2008). Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*, 132(4), 645–660.
- Zhao, W., Kruse, J.P., Tang, Y., Jung, S.Y., Qin, J. y Gu, W. (2008). Negative regulation of the deacetylase SIRT1 by DBC1. *Nature*, 451(7178), 587-590.