

Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto de Investigaciones Biomédicas

**Papel de la exposición a un Ambiente Enriquecido en el
Control de la Neurogénesis del Giro Dentado de la Rata y
sus Implicaciones Funcionales en el Envejecimiento**

**Tesis que para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Biomédicas**

Psic. Perla X. Leal Galicia

Dirige: Dra. Clorinda Arias Álvarez



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A la maravillosa Universidad Nacional Autónoma de México por la magnífica formación que he recibido y por acogerme estos 18 años de mi vida.

A mis padres, Norma y Mario por su cariño y ejemplo de honestidad y lucha.

A mi hermano Mario por todo su apoyo y cariño.

A mi hermano Ángel, por ser la luz de mi vida.

A la Dra. Clorinda Arias, muchas gracias por todo tu apoyo, paciencia, guía y sobre todo por tu amistad.

A Armando, por el respaldo apoyo y cariño durante este proceso de aprendizaje.

A Anita, Manu y Gio, queridos amigos.

A Gaby Michel y su amistad sin frontera.

AGRADECIMIENTOS

A todos los amigos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Vicente, Pau, Ricardo, Karina, Victor, Javi, Lalo, Dianita, Angélica y todos los que faltan.

A la QFB Patricia Ferrera por su ayuda técnica y sus consejos.

A la Biol. Teresa Montiel por sus ayuda y sugerencias técnicas que fueron cruciales para el desarrollo de éste trabajo.

Un agradecimiento muy especial al Dr. Alfonso Escobar por su valiosa amistad.

A mis queridos tíos Eva y Alfonso y a mis primos, en especial a Tany, Alfonso, Christian.

A los hermanos que la vida me regaló, Ángeles, Hebert y Eric.

INDICE

I. RESUMEN.....	1
II. ABSTRACT.....	2
III. INTRODUCCIÓN.....	3
IV. ANTECEDENTES	
4.1 Efecto del enriquecimiento ambiental a nivel conductual, celular y molecular.....	5
4.2 Neurogénesis adulta.....	19
4.3 Cuantificación de la Neurogénesis Adulta.....	19
4.4 Posible papel funcional de la neurogénesis.....	24
4.5 Factores que regulan la neurogénesis.....	25
4.5.1 Reguladores Negativos.....	25
4.5.1.1 Efecto del envejecimiento en la neurogénesis.....	25
4.5.1.2 Efecto de estrés en la neurogénesis.....	26
4.5.2 Reguladores Positivos.....	26
4.5.2.1 Actividad Física Voluntaria.....	26
4.5.2.2 Ambiente Enriquecido.....	27
V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	28
5.1 Problema 1.....	28
5.2 Problema 2.....	28
VI. OBJETIVOS.....	29
6.1 Estrategia Experimental 1.....	29
6.2 Estrategia Experimental 2.....	29

VII. MATERIALES Y METODOS.....	30
7.1 Estrategia Experimental 1.....	30
7.2 Estrategia Experimental 2.....	35
VIII. RESULTADOS.....	39
Exposure to Environmental Enrichment Elicits Differential Hippocampal Cell Proliferation: Role of Individual Responsiveness to Anxiety	40
Long-term exposure to environmental enrichment since youth prevents recognition memory decline and increases synaptic plasticity markers in aging.....	51
IX. DISCUSIÓN.....	59
X. CONCLUSIONES.....	62
XI. PERSPECTIVAS.....	63
XII. REFERENCIAS.....	64
XIII. ARTICULOS DERIVADOS DEL PROYECTO DE TESIS	

I. RESUMEN

El empleo de terapias basadas en la actividad física y cognitiva ha sido ampliamente difundido en la última década dado los grandes beneficios que reporta en el sujeto tanto a nivel conductual como fisiológico. Estas estrategias permiten aliviar y prevenir el desarrollo de síntomas físicos y cognitivos que se presentan tanto en el envejecimiento normal como en condiciones patológicas. Los mecanismos que regulan el efecto de estas terapias han sido poco estudiados. Uno de los factores regulados por este tipo de intervenciones es la neurogénesis adulta, especialmente la que se lleva a cabo en el hipocampo, una estructura estrechamente relacionada con procesos de aprendizaje y memoria así como en procesos degenerativos. Se ha documentado que la exposición a ambientes enriquecidos promueve la generación e integración de nuevas neuronas en el hipocampo y brinda un efecto protector sobre el envejecimiento normal y patológico. Por otra parte, el estar expuesto a un ambiente enriquecido reporta un beneficio en el desempeño de tareas conductuales. Sin embargo, se ha prestado poca atención al nivel de actividad que cada sujeto tiene en el sistema de enriquecimiento ambiental, y si las estas diferencias en el nivel de actividad tienen relación con el efecto promovido por la exposición al ambiente enriquecido. Por otra parte, se ha explorado poco el efecto que tienen en el envejecimiento el estar expuesto a el enriquecimiento ambiental desde una edad temprana y por un periodo prolongado (18 meses en nuestro caso). En el presente trabajo abordamos las anteriores preguntas demostrando primeramente que hay una relación entre el nivel de actividad desplegado por cada animal y los efectos benéficos promovidos por el ambiente enriquecido. Por otra parte mostramos que la exposición crónica a un ambiente enriquecido previene la disminución natural de la neurogénesis del hipocampo y favorece el desempeño en una tarea de memoria durante el envejecimiento.

II. ABSTRACT

The employment of activity-depending therapies has been widely used in the last decade because they use report beneficial effects at both, physiological and morphological levels. The mechanisms underlying these effects still unknown. One of the proposed mechanisms behind this type of interventions is the modulation of adult hippocampal neurogenesis. It has been described that environmental enrichment promotes the hippocampal cell proliferation, the integration of the new generated cells to the hippocampal network, delays the age-depending decrease in neurogenesis and improves cognitive functions during aging. Has been little explored the impact of the activity level developed by the rats in the enrichment system on the environmental enrichment-beneficial effects. On the other hand, it has been demonstrated the environmental enrichment effect in delay the age-depending decrease in neurogenesis but has been less studied the impact of the early and continuous exposition to environmental enrichment in the aged brain. In this work we explore the relationship between the activity level displayed by rats in the environmental enrichment sessions and its impact in anxiety levels and hormonal outcomes, as well as the effect of the life-long exposition to environmental enrichment in prevents memory decay and reduced neurogenesis in aged rats.

III. INTRODUCCIÓN

En nuestros días la esperanza de vida se ha incrementado y con ello surge la necesidad de desarrollar estrategias que permitan preservar en las mejores condiciones las habilidades físicas y cognitivas de las personas. Estudios epidemiológicos han demostrado que el llevar una vida activa, tanto física como intelectualmente provee un factor protector retrasando el declive en las habilidades cognitivas que ocurren durante el envejecimiento natural (Colcombe et al., 2004a; Colcombe et al., 2004b; Wilson et al., 2002), así como un efecto protector en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Sasco et al., 1992, Jankowsky et al., 2005; Lazarov et al., 2005; Wolf et al., 2006). Sin embargo, se desconoce el mecanismo mediante el cual se regula este efecto de preservación dependiente de la actividad. Uno de los factores que se ha propuesto como regulador de este efecto es la neurogénesis adulta (NA), un proceso que se da en el cerebro en la zona sub ventricular y en el giro dentado del hipocampo, zona donde se ha observado que la neurogénesis presenta modificaciones en respuesta a diversos estímulos del medio ambiente, uno de los cuales es la exposición a un ambiente enriquecido, el cual promueve cambios en la neurogénesis y en la conducta del sujeto (Kuhn et al., 1996, Kempermann et al., 1997; Kronenberg et al., 2003; Kempermann et al., 2006).

El Ambiente Enriquecido (AE) es un modelo experimental que nos permite estudiar los cambios conductuales y morfológicos promovidos por la actividad física e intelectual. En el presente trabajo emplearemos este modelo para establecer el impacto que tiene el nivel de actividad que el animal tienen con el AE sobre la NA, así como el efecto de la exposición crónica (18 meses) al AE en el envejecimiento. En los siguientes apartados describiremos en qué consiste el AE, cómo regula la neurogénesis adulta y qué efecto tienen en el envejecimiento.

I. ANTECEDENTES

4.1 Efecto del enriquecimiento ambiental a nivel conductual, celular y molecular.

Capítulo 11

EFEECTO DEL ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL A NIVEL CONDUCTUAL, CELULAR Y MOLECULAR.

Perla Leal Galicia y Clorinda Arias Álvarez

El medio ambiente es un elemento crucial en la formación de la personalidad de los sujetos. La interacción continua entre el sustrato biológico y el sustrato ambiental conforma el desarrollo de los procesos cognitivos del individuo; en la actualidad contamos con evidencia experimental que sustenta esta posición. Trabajos con técnicas de imagen han permitido establecer que un medio ambiente estresante o carente de estímulos tiene un impacto a nivel anatómico-funcional. Un claro ejemplo de esto es la disminución observada en el volumen del hipocampo de sujetos que fueron víctimas de abuso o que presentan estrés post-traumático (Bremner et al., 1995; Sapolsky et al., 1990). Así mismo, la privación sensorial en niños da como resultado problemas en el desarrollo del lenguaje. Por otra parte se ha reportado que ambientes que promueven actividades físicas, cognitivas, sensoriales y sociales promueven cambios morfológicos y fisiológicos en los sujetos expuestos a éste (Rosenzweig et al., 2005; van Praag et al., 2000). En el presente capítulo trataremos los efectos del enriquecimiento ambiental aplicado a modelos experimentales, tanto en animales intactos así como en modelos de diversas patologías, esto nos permitirá entender a mayor profundidad el mecanismo que regula el efecto que tiene un medio ambiente estimulante en el cerebro y la conducta.

QUE ES EL ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL.

El enriquecimiento ambiental consiste en proporcionar al sujeto un espacio con mayores estímulos físicos y sensoriales de los que obtiene en condiciones de alojamiento en el laboratorio. Para animales de investigación se toma como ambiente enriquecido el incremento de las oportunidades para obtener estimulación sensorial por medio de la interacción con objetos inanimados novedosos, oportunidad de tener interacción social, ya que son expuestos a la caja de enriquecimiento en comunidades, así como la posibilidad de

incrementar su actividad física ya que se les brinda un espacio más grande y ruedas donde pueden correr (van Praag et al., 2000., Will et al., 2004; Kolb y Whishaw, 2003).

La idea del enriquecimiento ambiental surgió en 1940 cuando el Dr. Donald Heeb llevó unas ratas de laboratorio a vivir en su casa, cuando estas crecieron noto que desplegaban conductas diferentes a las que vivían en condiciones habituales de laboratorio de tal manera que se planteó medir el desempeño de sus mascotas en una prueba de laberinto. Lo que observó fue que sus ratas ejecutaban mejor las pruebas con respecto a las que vivían en el laboratorio. Para los años 70 el grupo del Dr. Rosenzweig en la universidad de Berkeley, California sistematizó el modelo del enriquecimiento ambiental adaptándolo para su estudio en el laboratorio. El modelo de ambiente enriquecido (AE) consiste en cajas grandes con aserrín en el piso y diversos objetos como tubos, pelotas, cascabeles, ruedas para correr, etc. Estos elementos son cambiados de posición y/o sustituidos por otros para que así el sujeto reciba estímulos novedosos a diario (Kempermann et al., 1997; Will, et al., 2004; Whishaw y Kolb, 2005). Los protocolos de exposición a AE son variados en cuanto a el tiempo de la exposición, la edad de inicio, en algunos casos los sujetos viven en la caja de enriquecimiento, en otros los sujetos habitan en cajas convencionales de laboratorio y son colocados en la caja de enriquecimiento por espacio de 2 a 3 horas por varios días e incluso meses (Kempermann et al., 1997; Rosenzweig et al., 2005; Nithianantharajah y Hannan, 2006).

A partir de los trabajos del grupo de Rosenzweig, se han realizado numerosos estudios para comprender el efecto del enriquecimiento ambiental en la conducta y el organismo. Asimismo, se han estudiado las modificaciones que por efecto del AE se observan en modelos de diversas patologías como la enfermedad de Huntington, la demencia tipo Alzheimer, la depresión, la isquemia cerebral, entre otros. En los siguientes apartados abordaremos las modificaciones generadas por la exposición a un AE a nivel celular, neuroquímico y genético, así como un panorama del empleo del AE en enfermedades neurológicas.

Efectos funcionales y celulares de la exposición a ambientes enriquecidos

I. Efectos celulares: Dendritogénesis, sinaptogénesis y neurogénesis.

Aunque los efectos que produce en el cerebro la exposición a ambientes enriquecidos (AE) se han reconocido desde hace mucho tiempo, el estudio detallado de estos cambios se empezó a realizar de manera sistemática desde 1964 cuando Rosenzweig, Bennett y colaboradores mostraron que la exposición de ratas a experiencias complejas producía cambios tanto neuroanatómicos como neuroquímicos y conductuales.

De la variedad de efectos que pueden detectarse en el cerebro, los más evidentes son: aumentos en el peso cerebral, aumento en el número y ramificaciones dendríticas,

incrementos en la neurogénesis, expresión diferencial de genes relacionados con eficiencia sináptica, etc (Will et al., 2004; Rosenzweig et al., 2005; Wishaw y Kolb 2005).

Algunos trabajos ha demostrado por ejemplo, que la exposición a sesiones de enriquecimiento multisensorial en ratas de 10 a 24 días postnatales induce un incremento significativo de los árboles dendríticos de neuronas piramidales de la corteza occipital (Venable et al., 1989). Por otro lado, se ha visto que el AE promueve la rehabilitación neurológica de animales sometidos a paradigmas de desnutrición. Así, el AE durante la rehabilitación nutricional incrementa la arborización dendrítica y el grosor de la corteza occipital (Carughi et al., 1989).

Existe evidencia que muestra un aumento en la arborización dendrítica y en áreas de contacto sináptico así como en el número de sinapsis por neurona en corteza la occipital en ratas expuestas a AE (Churchill et al., 2002). Experimentos más recientes muestran que la exposición a ambientes complejos induce aumentos en el número de contactos sinápticos en todo el cerebro, tanto en la corteza como en regiones subcorticales (Nithianantharajah et al., 2004).

Con respecto al crecimiento de neutritas posterior a exposición a animales en ambientes con estimulación sensorial múltiple, se ha estudiado detalladamente que la complejidad estructural de las neuronas cambia al incrementarse las ramificaciones dendríticas. Este último efecto se ha cuantificado de manera cuidadosa y ha demostrado que en ratones después de las sesiones de AE, existe una ramificación dendrítica compleja que resulta en la aparición de ramas de tercero y cuarto orden sin que se modifique la longitud total de las ramas (Volkmar et al., 1972). En este mismo sentido, además del incremento de los árboles dendríticos, también aumenta el número de espinas dendríticas, lo que apoya que los AE promueven la formación de nuevos contactos sinápticos. Varios estudios han demostrado que el enriquecimiento reduce la densidad neuronal, pero incrementa la proporción neurona/sinapsis y el diámetro de los contactos sinápticos (Bhide y Bedi, 1984).

Además de la sinaptogénesis, son aparentes una multitud de cambios morfológicos asociados con los efectos conductuales de la exposición a AE, entre ellos los aumentos en la producción de células gliares y el incremento en la formación de nuevos vasos sanguíneos (Black et al., 1990).

Siendo el hipocampo una de las estructuras cerebrales cuya participación en procesos de atención, memoria y aprendizaje ha sido confirmada, muchos de los estudios sobre los cambios estructurales que ocurren posterior al enriquecimiento se han enfocado a esta región. Así, se ha mostrado que los cambios más significativos en cuanto a la sinaptogénesis, y al incremento en la arborización dendrítica ocurren en las neuronas granulares del giro dentado y en las neuronas piramidales de las áreas de CA1 y CA3 (Diamond et al., 1976). En particular, se conoce que las ratas hembras expuestas a AE

desarrollan mayor número de dendritas por neurona en las células del giro dentado del hipocampo que hembras control (Juraska et al., 1985).

Se han explorado la capacidad plástica de otras áreas cerebrales para presentar cambios morfológicos en respuesta a AE. El análisis de la lámina III de la corteza parietal muestra incrementos en la arborización dendrítica y número de sinapsis después de exponer ratas de 21 días a AE. Junto con estos cambios estructurales se ha observado que estos animales exhiben niveles altos de aptitud para el desempeño en tareas de navegación y habilidades de memoria de trabajo. Más aún, Leggio y colaboradores (2005) han demostrado que cuando cambian los requerimientos contextuales para una tarea espacial, los animales expuestos a AE son capaces de aplicar procedimientos espaciales almacenados en la memoria que les permite adquirir de manera más rápida estrategias eficientes de navegación (Leggio et al., 2005).

Dentro de los cambios que podemos mencionar a nivel de plasticidad se encuentra la neurogénesis en el hipocampo. Desde hace varias décadas se conoce que en cerebro existen áreas donde se generan neuronas de manera constante; estas neuronas se generan a partir de precursores neurales que pueden dar origen tanto a neuronas, glia y oligodendrocitos, hasta hoy se desconocen los mecanismos que rigen esta generación, sin embargo se sabe que ocurre durante toda la vida, que se da en varias especies incluyendo a los humanos y que es susceptible a estímulos como las lesiones, el ejercicio, la dieta, el estrés y el AE, el cual ha mostrado tener una gran influencia en la generación, supervivencia y diferenciación preferente hacia neurona, así mismo estos datos correlacionan con beneficios a nivel conductual (Kempermann et al., 1997; van Praag et al., 2000; Kronenberg et al., 2003). En nuestro laboratorio hemos observado que de manera contraria a lo que se había reportado, los efectos del enriquecimiento pueden variar entre los individuos de manera significativa; esta variación se asocia con niveles de actividad dentro del grupo, niveles de hormonales y el grado de ansiedad que experimenta cada sujeto. Así los sujetos con altos niveles de ansiedad, poca interacción con el sistema de enriquecimiento, y bajos niveles de testosterona en suero también tienen poca neurogénesis, el efecto contrario se observa en sujetos con alto desempeño en el AE: poca ansiedad y altos niveles de testosterona en suero, lo que nos proporciona un panorama más detallado de la influencia del medio en el organismo (Leal-Galicia et al., 2007).

Tomando en conjunto las evidencias presentadas, es posible que la exposición a un AE promueva cambios estructurales plásticos en el sistema nervioso central (SNC) que muy probablemente contribuyen a los efectos positivos que se observan en cuanto al desempeño de habilidades cognitivas.

II. Cambios en neurotransmisores

Estudios muy tempranos en el campo del enriquecimiento ambiental muestran un efecto positivo sobre los niveles de algunos neurotransmisores. Se han observado concentraciones mayores de acetilcolina después de exponer a roedores a AE en comparación con los sujetos no expuestos a éste estímulo (Rosenzweig y Bennet, 1969).

Estos hallazgos son muy interesantes a la luz del papel de la acetilcolina en el desempeño de tareas de aprendizaje. Uno de los componentes importantes del AE es la posibilidad de hacer ejercicio, el cual puede modificar varios sistemas de neurotransmisores, por lo que se ha evaluado detalladamente su papel en el mejoramiento de la actividad colinérgica en el SNC. En este sentido, tanto el AE como el ejercicio modifican positivamente la captura de colina en las terminales nerviosas aisladas del hipocampo y la corteza, lo que a su vez aumenta la síntesis de acetilcolina.

El enriquecimiento modifica diferentes aspectos bioquímicos de la neurotransmisión de varios sistemas. Por ejemplo, la exposición de roedores a AE aumenta selectivamente la expresión del gen receptor 1A de serotonina y por efecto del ejercicio físico hay un incremento de la modulación opioide y activación del sistema noradrenérgico y serotoninérgico (Chaouloff, 1989). El AE induce cambios en la expresión de subunidades de receptores para NMDA y AMPA, las cuales son parte integral de las vías de señalización glutamatérgica. Asimismo, existe evidencia de la participación de dichas subunidades en el reforzamiento sináptico y la potenciación a largo plazo (LTP por sus siglas en inglés; Tang et al., 2001; Naka et al., 2005).

En conjunto, dado que todos los sistemas de transmisión química mencionados influyen en tareas de aprendizaje y mecanismos directamente relacionados con la plasticidad sináptica es muy posible que sean partícipes de manera preponderante en los efectos benéficos obtenidos en las habilidades cognitivas como resultado del ejercicio físico y el AE.

III. Factores tróficos

Los mecanismos que subyacen a la variedad de cambios morfológicos resultantes de la exposición de animales a ambientes complejos son poco claros. Las neurotrofinas podrían influir en el desarrollo de cambios estructurales cerebrales y de plasticidad sináptica. De ellas, las más estudiadas son el factor de crecimiento neuronal (NGF) y el factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF).

Las neurotrofinas BDNF y NGF juegan un papel central en el mantenimiento de la supervivencia neuronal y en la plasticidad cerebral. Se ha demostrado que ambas participan en funciones cognitivas. Particularmente, la alta concentración del BDNF en el hipocampo

sugiere su papel esencial en la funcionalidad de esta región, así como en la LTP, que se considera una de las bases funcionales del establecimiento de la memoria.

En varios trabajos se ha mostrado que el ejercicio, la restricción calórica y la exposición a ambientes inducen un incremento intrahipocampal del RNA mensajero y de BDNF (Cotman y Berchtold, 2002). Además de estos efectos, las manipulaciones mencionadas inducen la neurogénesis del hipocampo, esta inducción se acompaña por una mejora en el desempeño de tareas de memoria (Kempermann et al., 1997). Por otra parte ha sido demostrado que el AE incrementa significativamente los niveles de NGF en el hipocampo (Pham et al., 1997).

De este modo, existe evidencia considerable que indica que el hipocampo es susceptible a influencias ambientales y que algunos de los efectos moleculares y en vías de señalización intraneuronal que induce condición de enriquecimiento ambiental, impactan positivamente en tareas de aprendizaje. Las neurotrofinas podrían estar participando notablemente en el establecimiento de dichos cambios plásticos, a mediano y largo plazo.

IV. Genes

Aunque existen pocos reportes sobre el efecto que tiene la exposición de animales a AE en cuanto al efecto sobre transcripción de genes, resulta interesante los datos reportados por Lazarov y colaboradores (2005), donde los animales expuestos a AE aumentan la expresión de genes que codifican para proteínas asociadas a procesos de aprendizaje y memoria. Por medio de microarreglos se ha demostrado que la exposición a ambientes ricos en estímulos sensoriales y ejercicio físico, inducen la expresión de una variedad de genes que codifican para proteínas que incluyen factores de crecimiento, citosinas, factor de crecimiento semejante a insulina 2, prostaglandina D2 sintetasa, trantiretina, BDNF y neprilisina (una enzima capaz de degradar a la proteína β -amiloide, la cual se acumula en pacientes con enfermedad de Alzheimer) (Lazarov et al., 2005).

Efecto benéfico del enriquecimiento ambiental en modelos de enfermedades neurológicas.

El enriquecimiento medioambiental ha mostrado tener un efecto benéfico sobre el desempeño de tareas conductuales, tanto en condiciones normales como patológicas (van Prag et al., 2000; Will et al., 2002; Nithianantharajah et al., 2006). La exposición al AE por 90 días mejora el desempeño de tareas de memoria a corto plazo en ratas hemidecorticadas; de manera interesante se observa un mayor efecto cuando el enriquecimiento se aplica posterior a la lesión y no antes de ella. Se ha propuesto que la noradrenalina juega un papel importante en este efecto ya que se reportó que animales con niveles bajos de este neurotransmisor tienen una recuperación más lenta, mientras que los animales expuestos al

AE muestran un incremento dicho neurotransmisor y tienen una recuperación funcional mayor y más rápida (Whishaw et al., 1984).

Tomando en consideración la mejora cognitiva en pacientes con síndrome de Down como resultado de la implementación de programas de educación especial en etapa temprana, un grupo español se planteo buscar el mecanismo que medía este efecto de tal manera que probaron en ratones que expresan una trisomia parcial en el cromosoma murino 16 que se caracteriza por la presencia de deficiencias cognitivas, hiperactividad, disrupciones conductuales y niveles de atención disminuidos, estos ratones fueron alojados a las 3 semanas de edad en cajas de enriquecimiento por 7 semanas y posteriormente los cerebros fueron disecados y procesados por medio de inmunohistoquímica para el análisis de células piramidales de la corteza prefrontal encontrando que en los no mutantes con enriquecimiento hay crecimiento del árbol dendrítico y mayor distribución de espinas dendríticas, lo cual no ocurrió en los ratones control no enriquecidos así como en aquellos con la mutación, tanto enriquecidos como no enriquecidos. Lo anterior sugiere alteraciones en los mecanismos que rigen el desarrollo y maduración de los circuitos corticales en los ratones mutantes (Dierssen et al., 2003).

Dentro del campo de estudio del retraso mental se encuentra el ocasionado por el síndrome del cromosoma X frágil , donde se observan alteraciones cognitivas, morfología neuronal inmadura y disminución en la proteína FMRP (siglas en ingles proteína de retraso mental cromosoma X frágil). Este síndrome es una de las formas hereditarias de retraso mental más común. En estos sujetos, durante el desarrollo embrionario se presenta repetición de trinucleótidos posterior a la mielinización que lleva al silenciamiento transcripcional del gen para la proteína FMRP que dan a lugar a un retraso mental de moderado a severo, deficiencia en atención, conducta autista y características físicas como cara alargada, orejas largas, laxitud articular y crecimiento testicular. Esta proteína está muy conservada entre humanos y roedores de tal manera que se consigue crear un modelo experimental con gran similitud abatiendo la proteína por medio de manipulaciones genéticas resultando en la presencia de las características morfo-funcionales del síndrome en los ratones. Una característica común entre el modelo animal y lo que sucede en el cerebro de estos sujetos es la presencia de espinas dendríticas inmaduras, largas y delgadas; a nivel molecular se reporta alteración en receptores a glutamato y bajos niveles de AMPA. Dado que ha sido reportado que la exposición al AE incrementa el árbol dendrítico, un grupo interdisciplinario conformado por investigadores de diversos países europeos probó el efecto del enriquecimiento medioambiental en ratones con la proteína FMRP inhibida, encontrando mejoras en el desempeño en tareas conductuales, incremento en la densidad sináptica en dendritas apicales y crecimiento del árbol dendrítico y de las espinas dendríticas, e incremento en la expresión proteínas de acoplamiento a receptores de glutamato (que son deficientes en estos sujetos) y AMPA, de manera muy interesante los

niveles de FMRP no cambian lo cual sugiere que el efecto del enriquecimiento no es dependiente de esta proteína (Restivo et al., 2005).

Otra condición en donde se ha probado el efecto del enriquecimiento ambiental ha sido en lesiones isquémicas. La isquemia ocurre cuando la irrigación sanguínea se suspende, provocando muerte celular necrótica en la zona afectada; al área de muerte se le denomina área de penumbra. En la isquemia cerebral hay pérdida de neuronas y contactos sinápticos y puede provocar daños conductuales y motores severos dependiendo de la zona afectada. La implementación del sistema de enriquecimiento ambiental en ratas con isquemia ha reportado efectos benéficos en plasticidad, como incremento de espinas dendríticas en la corteza (Biernaskie y Corbett, 2001; Johansson y Belichenko, 2002) crecimiento del árbol dendrítico y la neurogénesis en el hipocampo (Briones et al., 2000; Komitova et al., 2002), y en la zona sub-ventricular (Komitova et al., 2005). Asimismo, la exposición a un AE previa a la lesión protege de la muerte necrótica (Belayev et al., 2003), incrementa la expresión de genes que codifican para factores de crecimiento neural, la expresión de receptores de serotonina en el hipocampo y disminuye los niveles de glucocorticoides en ratas con isquemia global (Dahlqvist et al., 2003). En este trabajo se prueba el efecto del sistema de enriquecimiento complejo así como de sus componentes, es decir teniendo como condiciones experimentales sujetos en aislamiento, sujetos en aislamiento con rueda para correr, sujetos con interacción social en cajas grandes, sujetos con ejercicio e interacción social en cajas grandes y sujetos ambiente enriquecido. Se reporta mayor presencia de factores de crecimiento en los grupos de interacción social y enriquecimiento, en cambio, se encontró mayor expresión de receptores a serotonina en sujetos con ejercicio. Los niveles de BDNF (siglas en inglés de factor neurotrófico derivado de cerebro) se ven incrementados en la corteza prefrontal posterior a la exposición al AE en ratas control y con isquemia. Este factor se propone como mediador del efecto del enriquecimiento ambiental; está relacionado con la generación de neuronas durante el desarrollo embrionario y observan modificaciones su concentración en cerebro posterior al enriquecimiento (Zaho et al., 2001; Gobbo y Mara, 2004). Posterior al AE los sujetos con isquemia tienen un beneficio en el desempeño de tareas motoras, de aprendizaje y memoria (Biernaskie y Corbett, 2001; Farrel et al., 2001, Komitova et al., 2002).

La estimulación ambiental ha mostrado aminorar los factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como la demencia de tipo Alzheimer, que histopatológicamente se caracteriza por marañas neurofibrilares compuestas por agregados de proteína TAU fosforilada, y placas seniles compuestas por depósitos de proteína β -amiloide. Conductualmente se caracteriza por un déficit cognitivo progresivo principalmente en memoria a corto plazo y funciones ejecutivas. Ha sido reportado en estudios epidemiológicos que sujetos que llevan una vida intelectualmente activa, y que realizan actividades físicas y recreativas disminuyen el factor de riesgo para presentar la enfermedad (Jankowsky et al., 2005; Lazarov et al., 2005; Rosenzweig et al., 2005).

Para esclarecer que factores intervienen en el beneficio de la estimulación ambiental en la demencia tipo Alzheimer, se ha expuesto por varios meses al sistema de enriquecimiento a distintos tipos de ratones mutantes que expresan tanto las proteínas relacionadas a la enfermedad como las alteraciones conductuales relacionadas, encontrándose beneficios en tareas de aprendizaje y memoria espacial en animales con niveles elevados de β -amiloide (Jankowsky et al., 2005; Wolf et al., 2006). Por efecto de la exposición al AE se observa también reducción de los depósitos de la proteína β -amiloide en el hipocampo y corteza en transgenicos que expresan la proteína precursora del amiloide, así como activación de genes que codifican para la activación de proteínas relacionadas a aprendizaje, memoria, vasculogénesis, neurogénesis, vías de supervivencia celular, secuestro de β -amiloide y plasticidad, lo que sugiere que el ambiente enriquecido promueve la regulación a la alta de estas proteínas, lo que sugiere un posible mecanismo neuroprotector (Lazarov et al., 2005; Costa et al., 2006).

Otra condición donde se ha probado la efectividad del ambiente enriquecido como estrategia terapéutica es la enfermedad de Huntington, un desorden neurodegenerativo con base genética que se presenta en el adulto medio; produce alteraciones motoras, cambios de personalidad y demencia. Es de desarrollo lento y lleva a una muerte prematura. Se reporta en cerebros de estos pacientes alteración del cuerpo estriado y de la corteza cerebral, así como disminución de receptores a dopamina D1 y D2 y a canabinoides CB1 en el cuerpo estriado y ganglios basales (van Dellen et al., 2000; Hockly et al., 2002; Glass et al., 2004).

En modelos de ratones transgenicos que mimetiza de manera muy cercana la enfermedad se probó el efecto del enriquecimiento encontrándose mejoras en conductas motoras y disminución en la pérdida de volumen corporal y cerebral (van Dellen et al., 2000; Hockly et al., 2002; Spires et al., 2004), disminución de la pérdida de los receptores a canabinoides CB1 en los ganglios basales (Glass et al., 2004). También se observa incremento en marcadores de regulación de vías de señalización de dopamina en corteza y estriado, así como de BDNF en corteza, más no en estriado, lo que sugiere prevención en los defectos del transporte anterogrado de esta neurotrofina (Spires et al., 2004) además de retraso en el desarrollo y establecimiento de los síntomas de la enfermedad (van Dellen et al., 2000).

Conclusiones

Se han hecho grandes progresos con respecto al estudio de los mecanismos que subyacen a los efectos benéficos de la exposición a AE que se expresan a nivel conductual, celular y molecular. La vasta mayoría de estudios se han realizado en animales de experimentación y en modelos animales de enfermedades neuropsiquiátricas. Quedan abiertas muchas preguntas, particularmente lo que respecta al impacto que el AE pueda tener en los humanos, durante el desarrollo, el envejecimiento y las diferentes patologías del SNC. Algunas de estas preguntas incluyen las siguientes: ¿Existen edades críticas para obtener los efectos benéficos del AE?, ¿qué aspectos del AE impactan de manera particular en cada

una de las habilidades cerebrales que se exploran?, existen diferencias entre sexos y edades para cada aspecto particular que el AE estimula en el cerebro?.

Las respuestas a algunas de estas podrán permitir el desarrollo de terapias no farmacológicas que beneficien aspectos de salud cerebral y promuevan un envejecimiento exitoso.

Referencias

Belayev, A., Saul, I., Liu, Y., Zhao, W., Ginsberg, M., Valdes, M., Busto, R. y Belayev, L. (2003) “Enriched environment delays the onset of hippocampal damage after global cerebral ischemia in rats”. *Brain Research* 964: 121–127.

Bennett, D.A., Diamond, M.C., Krech, D. y Rosenzweig, M.R. (1964) “Chemical and anatomical plasticity of brain”. *Science*, 146: 610–619.

Bhide, P.G. y Bedi, K.S. (1984) “The effects of a lengthy period of environmental diversity of well-fed and previously undernourished rats. II. Synapse to neurons ratios”, *Journal of Comparative Neurology.*, 227:305–310.

Biernaskie, J. y Corbett, D. (2001) “Enriched rehabilitative training promotes improved forelimb motor function and enhanced dendritic growth after focal ischemic injury” *The Journal of Neuroscience*, 21(14):5272–5280.

Black, J.E. Isaacs, K.R., Anderson, B.J., Alcantara, A.A. y Greenough, W.T. (1990) “Leaning causes synaptogenesis, whereas motor activity causes angiogenesis, in cerebellar cortex of adult rats”. *Proceedings .of Natural Academy .of Science. USA*, 87:5568–5572.

Bremner JD, Randall P, Scott TM, Bronen RA et al., (1995) MRI-based measurement of hippocampal volume in patients with combat-related posttraumatic stress disorder. *Amm J. of Psych*, 152, 973-981.

Briones, T., Therrien, B., y Metzger, B. (2000) “Effects of environment on enhancing functional plasticity following cerebral ischemia” *Biological Research For Nursing.* 1(4):299-309.

Carughi, A., Carpenter, K.J, Diamond, M.C. (1989) “Effect of environmental enrichment during nutritional rehabilitation on body growth, blood parameters and cerebral cortical development of rats”, *Journal of Nutriology*, 119:2005-2016.

Chaouloff, F. (1989) “Physical exercise and brain monoamines: a review”, *Acta Physiology, Scand.* 137:1–13.

Churchill, J.D., Galvez, R., Colcombe, S., Swain, R.A., Kramer, A.F. y Greenough, W.T. (2002) "Exercise, experience and the aging brain", *Neurobiology of Aging*. 23:941–955.

Costa ,D., Cracchiolo, J., Bachstetter, A., Hughes, T., Bales, K., Paul, S., Mervis, R., Arendash, G., y Potter, H. (2006) "Enrichment improves cognition in AD mice by amyloid-related and unrelated mechanisms". *Neurobiology of aging* en prensa.

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

Dahlqvist, P., Risedal, A., Rönbäk, A., Nergårdh, R., Johansson, IM, Seckl, J., Johansson, B., y Olsson, T. (2003) "Effects of postischemic environment on transcription factor and serotonin receptor expression after Permanent focal cortical ischemia in rats" *Neuroscience* 119: 643–652.

Diamond, M.C., Ingham, C.C., Johnson, R.E., Bennett, E.L. y Rosenzweig, M.R. (1976) "Effects of environment on morphology of rat cerebral cortex and hippocampus". *Journal of Neurobiology.*, 7:75–85.

Dierssen, M., Benavides-Piccione, R., Martínez-Cué, C., Estivill, X., Flórez, J., Elston, J y De Felipe, J. (2003) "Alterations of Neocortical Pyramidal Cell Phenotype in the Ts65Dn Mouse Model of Down Syndrome: Effects of Environmental Enrichment". *Cerebral Cortex* 13(7): 759-764.

Farrell, R., Evans, S., y Corbett, T., (2001) "Environmental enrichment enhances recovery of function but exacerbates ischemic cell death" *Neuroscience* 107(4): 585-592.

Glass, M., van Dellen, A., Blakemore, C., Hannan, A. J. y Faull, R. L. M. (2004) "Delayed onset of huntington_s disease in mice in an enriched environment correlates with delayed loss of cannabinoid cb1 receptors" *Neuroscience* 123: 207–212.

Gobbo, O.L. y O'Mara, S.M. (2004) "Impact of enriched-environment housing on brain-derived neurotrophic factor and on cognitive performance after a transient global ischemia". *Behavioural Brain Research* 152: 231–241.

Hockly, E., Cordery, P., Woodman, B., Mahal, A., van Dellen, A., Blakemore, C., Lewis, C., Hannan, A. y Bates, G. (2002) "Environmental Enrichment Slows Disease Progression in R6/2 Huntington's Disease Mice" *Annals Neurology* 51:235–242.

Jankowsky, J., Melnikova, T., Fadale, J., Xu, G., Slunt, G., Gonzales, V., Younkin, L., Younkin, S., Borchelt, D. y Savonenko, A. (2005) "Environmental enrichment mitigates cognitive deficits in a mouse model of alzheimer's disease". *The Journal of Neuroscience*, 25(21):5217–5224.

Johansson, B., y Belichenko, P., (2002) “Neuronal plasticity and dendritic spines: effect of environmental enrichment on intact and postischemic rat brain”. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, **22**:89–96.

Juraska, J.M., Fitch, J.M., Henderson, C. y Rivers, N. (1985) “Sex differences in the dendritic branching of dentate granule cells following differential experience”. *Brain Research*, 333:73–80.

Kempermann, G., Kuhn, H.G. y Gage, F.(1997) “More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment”. *Nature* 3;386(6624):493-495.

Kolb, B. y Whishaw, I. (2003) “Human neuropsychology” Worth Publishers. Fifth edition.

Komitova, M., Perfilieva, E., Mattsson, B., Eriksson, P. y Johansson, B. (2002) “Effects of Cortical Ischemia and Postischemic Environmental Enrichment on Hippocampal Cell Genesis and Differentiation in the Adult Rat”. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 22:852–860.

Komitova, M., Mattsson, B., Johansson, B., y Eriksson, P. (2005) “Enriched Environment Increases Neural Stem/Progenitor Cell Proliferation and Neurogenesis in the Subventricular Zone of Stroke-Lesioned Adult Rats”. *Stroke*, 36: 1278-1282.

Kronenberg, G. Reuter, K., Steiner, B., Brandt, M., Jessberger, S., Yamaguchi, M., y Kempermann, G., (2003) “Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampal respond differently to physiologic neurogenic stimuli”. *The Journal Of Comparative Neurology* 467:455-463.

Lazarov O, Robinson J, Tang Y P, Aristón I S, Korade-Mirnic Z, Lee V M, Hersh L B, Sapolsky R M, Mirnic K, y Sisodia S S. 2005. Environmental enrichment reduces A- β levels and amyloid deposition in transgenic mice. *Cell* 120:701-713.

Leal-Galicia, P., Sáldivar-González, A., Morimoto, S. y Arias, C. (2006) “Exposure to environmental enrichment elicits differential hippocampal cell proliferation: role of individual responsiveness to anxiety” *Developmental Neurobiology* 67:395-405.

Leggio, M.G., Mandolesi, L., Federico, F., Spirito, F., Ricci, B., Gelfo, F., y Petrosini, L. (2005) “Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat”. *Behavioral Brain Research.*, 163:78-90.

Naka, F., Narita, N., Okado, N. y Narita, M. (2005) “Modification of AMPA receptor properties following environmental enrichment”. *Brain Development*, 27:275–278.

Nithianantharajah, J., Levis, H. y Murphy, M. (2004) “Environmental enrichment results in cortical and subcortical changes in levels of synaptophysin and PSD-95 proteins”. *Neurobiology of Learning and Memory.*, 81:200–210.

Nithianantharajah, J. y Hannan, A.J. (2006) “Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system”. *Nature Review Neuroscience* 7(9):697-709.

Pham, T.M., Soderstrom, S., Henriksson, B.G., y Mohammed, A.H. (1997) “Effects of neonatal stimulation on later cognitive function and hippocampal nerve growth factor”, *Behavioral Brain Research.*, 86:113–120.

Rasmuson, S. y cols., (1998) “Environmental enrichment selectively increases 5-HT1A receptor mRNA expression and binding in the rat hippocampus”. *Molecular Brain Research.*, 53:285–290.

Restivo, L., Ferrari, F., Passino, E., Sgobio, C., Bock, J., Oostra, B., Bagni, C., y Ammassari-Teule, M., (2005) “Enriched environment promotes behavioral and morphological recovery in a mouse model for the fragile X syndrome”. *Proceedings of Natural Academic of Science*, 102(32): 11557–11562.

Rosenzweig, M.R. y Bennett, E.L. (1969) “Effects of differential environments on brain weights and enzyme activities in gerbils, rats, and mice”. *Development. Psychobiology.*, 2:87–95.

Rosenzweig, M.R., Breedlove, S.M., y Watson, N. V. (2005) “Biological Psychology: an introduction to behavioral and cognitive neuroscience”. Sinaur Associates, Inc. Publishers, Sutherland, Massachusetts. Fourth Edition.

Sapolsky, R.M., Uno, H., Rebert, C.S., and Finch, C.E. (1990) Hippocampal damage associated with prolonged glucocorticoid exposure in primates. *Journal of Neuroscience*, 10:2897-2902.

Spires, T., Grote, E., Varshney, N., Cordery, P., van Dellen, A., Blakemore, C., y Hannan, A. (2004) “Environmental Enrichment Rescues Protein Deficits in a Mouse Model of Huntington’s Disease, Indicating a Possible Disease Mechanism”. *The Journal of Neuroscience*, 24(9):2270 –2276.

Tang, Y.P., Wang, H., Feng, R., Kyin, M. y Tsien, J.Z. (2001) “Differential effects of enrichment on learning and memory function in NR2B transgenic mice”. *Neuropharmacology*, 41:779–790.

van Dellen, A., Blakemore, C., Deacon, R., York, D., y Hannan, A. (2000) “Delaying the onset of Huntington’s in mice. This unremitting disease develops later in animals stimulated by their environment”. *Nature* 404(13):721-722.

van Praag, H.M., Kermpermann, G., y Gage, F. (2000)“Neural consequences of environmental enrichment.”. *Nature Review Neuroscience* 1(3):191-198.

Venable, N., Fernández, V., Diaz, E., Pinto-Hamuy, T. (1989) “Effects of preweaning environmental enrichment on basilar dendrites of pyramidal neurons in occipital cortex: a Golgi study”. *Development Brain Research.*, 49:140-144.

Volkmar, F.R. y Greenough, W.T. (1972) “Rearing complexity affects branching of dendrites in the visual cortex of the rat”. *Science*, 176:1445–1447.

Whishaw, I.Q., Zaborowski, J.A., y Kolb, B. (1984) “Postsurgical enrichment aids adult hemidecorticate rats on a spatial navigation task”. *Behaviour Neural Biology* 42(2):183-190.

Whishaw, I.Q., Sutherland, R.J., Kolb, B. y Becker, J. B. (1986) “Effects of neonatal forebrain noradrenaline depletion on recovery from brain damage: performance on a spatial navigation task as a function of age of surgery and postsurgical housing”. *Behaviour Neural Biology*, 46(3):285-307.

Whishaw, I. y Kolb, B. (2005) “The behavior of the laboratory rat. A handbook with test”. *Oxford University Press*, Nueva York E.U.

Will, B., Galani, R., Kelche Ch, y Rosenzweig M. (2004) “Recovery from brain injury in animals: relative efficacy of environmental enrichment, physical exercise or formal training (1990–2002)”. *Progress in Neurobiology*, 72, 167–182.

Wolf, S., Kronenberg, G., Lehmann, K., Blankenship, A., Overall, R., Staufenbiel, M. y Kempermann, G. (2006) “Cognitive and physical activity differently modulate disease progression in the amyloid precursor protein (app)-23 model of alzheimer’s disease”. *Biological Psychiatry* en prensa.

Zhao, L., Risedal, A., Wojcik, A., Hejzlar, J., Johansson, B., y Kokaia, Z. (2001) “Enriched environment induces brain-derived neurotrophic factor levels in rat forebrain after focal stroke”. *Neuroscience Letters* 305: 169-172.

4.2 Neurogénesis adulta.

Se define como neurogénesis adulta (NA) el proceso mediante el cual se generan nuevas neuronas en el cerebro adulto a partir de una población endógena de precursores neurales. El proceso inicia con la división asimétrica del precursor tipo-1 seguida por la expansión y migración de los precursores tipo 2a y 2b, y termina con la diferenciación e integración de la nueva célula (Kuhn et al., 1996; Fukuda et al., 2003; Brandt et al., 2003; Kempermann et al., 2004). Se toma como NA aquella que ocurre cuando el animal ya es sexualmente maduro. Se hace esta distinción porque en el periodo postnatal existen regiones que siguen generando neuronas (como el cerebelo), pero ello es considerado como una continuación del desarrollo embrionario (Rakic 2002; Kempermann 2006). El cerebro adulto conserva su capacidad neurogénica en dos zonas restringidas: la zona sub-ventricular (ZSB) (Lois y Alvarez-Buylla, 1993) y el giro dentado del hipocampo (Altman 1962; Altman y Das; 1965, Kaplan et al., 1977) (Fig. 1).

En el hipocampo, las células precursoras se encuentran localizadas en el borde entre el hilus y la capa de células granulares del giro dentado, denominada zona sub-granular (ZSG) (Fig. 1) (Altman y Das, 1965; Palmer et al., 1997; Kempermann 2002, 2004). En esta zona los precursores generan nuevas células que migran hacia la capa granular, donde se diferencian e integran al circuito extendiendo sus procesos hacia CA3 (Altman y Das, 1965; Kuhn et al., 1996; van Praag et al., 2002; Fukuda et al., 2003; Filipov et al., 2003; Kempermann et al., 2004)(Fig. 2). Este proceso se lleva a cabo durante toda la vida observándose una disminución como resultado de la edad (Kuhn et al., 1996; Kronenberg et al., 2006). Los precursores neurales del hipocampo adulto tienen la capacidad de generar neuronas granulares, interneuronas GABAérgicas, oligodendrocitos y astrocitos (Palmer et al., 1997; Cameron and McKay, 2001; van Praag et al., 2002; Liu et al., 2003).

4.3 Cuantificación de la Neurogénesis Adulta.

Para medir el complejo proceso que comprende la NA se han establecido parámetros de cuantificación, de los cuales inicialmente se consideraron la proliferación, diferenciación y supervivencia de las nuevas células, los cuales se comentan a continuación:

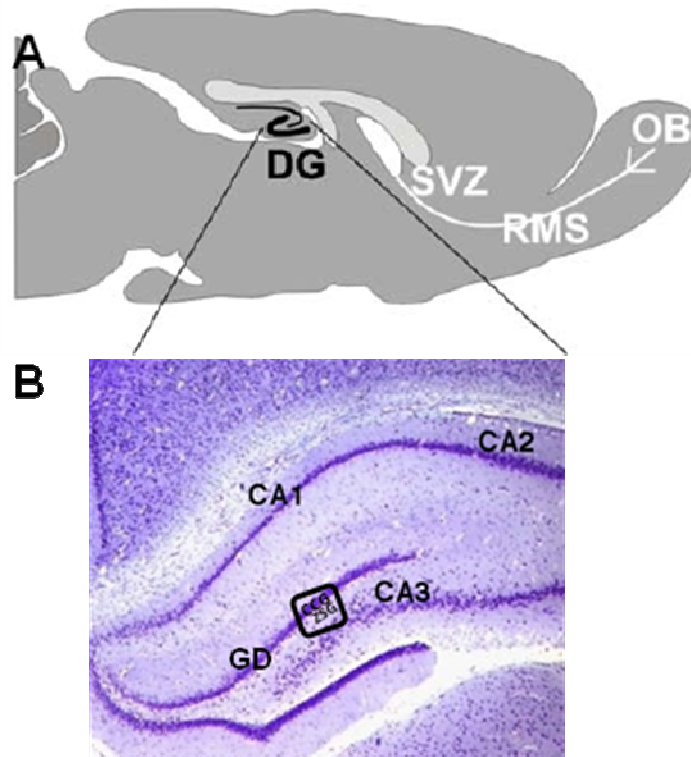


Fig. 1 A) representación esquemática de la vista sagital de un cerebro de rata señalando el hipocampo. B) Corte coronal de cerebro de rata señalando las zonas del hipocampo, así como la capa de células granulares (CCG) y la zona sub granular (ZSG) donde se encuentra el nicho de células precursoras (Modificada de von Bohlen 2007)..

Proliferación: se entiende como la generación de nuevas células, las cuales se identifican mediante la visualización de análogos de nucleótidos, los cuales se incorporan por competencia durante la fase de síntesis de DNA. En los primeros trabajos donde se demostró la presencia de nuevas células en el cerebro adulto, Joseph Altman (1962, 1965) empleó inyecciones de ^3H -timidina, e identificó las células que la incorporaron mediante técnicas de autorradiografía. Varias décadas después se utilizó un análogo de timidina, la BrdU (2-bromo-deoxi-uridina); éste análogo tiene la ventaja de ser identificado por inmunohistoquímica y puede ser cuantificado por estereología (Miller y Nowakowski, 1988, Gould y Gross, 2002). Ambas técnicas permiten marcar *in vivo* el número de células en proliferación. Aunque identificar la cantidad de células en proliferación es fundamental para estudiar la neurogénesis, esta identificación solo permite establecer qué cantidad de

células están duplicando su material genético. Sin embargo, este método no permite conocer el linaje de las nuevas células o establecer si se integraron a la circuitería hipocampal, ni distinguir en que estadio del desarrollo se encuentran (Rakic 2002; Kempermann 2004), por lo que es necesario identificar en qué linaje diferenciaron las nuevas células.

Diferenciación: por diferenciación se entiende el proceso por el cual una nueva célula indiferenciada adquiere una identidad celular. La implementación de técnicas de detección por inmunofluorescencia ha permitido establecer el fenotipo de las nuevas células en el hipocampo. Los primeros estudios en este respecto fueron en la década de 1990, la introducción de estas técnicas permitió confirmar de manera contundente la neurogénesis en el cerebro adulto así como los tipos de células generadas. Se conoce que las células precursoras del hipocampo dan a lugar neuronas glutamatérgicas, GABAérgicas y a astrocitos (Cameron et al., 1993; Palmer et al., 1996; Gould y Gross 2002; Rao y Shetty, 2004). Los marcadores empelados para la determinación de la identidad neuronal son la proteína nuclear soluble NeuN la cual se localiza en el núcleo de casi todas las neuronas post-mitóticas (Winner et al.,2002; Wolf et al., 1996; Mullen et al.,1992). Mientras que NeuN es expresada por neuronas maduras, la proteína Doblecortina (DCX) es considerada un marcador tardío de precursores en división y marcador temprano de neuronas post-mitóticas. DCX, puede ser detectado entre el día 12 a 16 post-mitótico, en el hipocampo adulto; DCX co-localiza con el 90% de células positivas a BrdU, lo cual sugiere su reciente formación y no presenta co-localización para marcadores gliales, lo que sugiere su especificidad para linaje neuronal (Rao y Shetty, 2004). Adicionalmente DCX no presenta co-localización con precursores tempranos (tipo-1 y tipo-2a) lo que sugiere que la nueva célula está avanzada en el proceso de toma de decisión de identidad celular (Kronenberg et la 2003; Kempermann et al., 2004). Esta idea se refuerza ya que la regulación a la baja de DCX coincide con el inicio de la expresión de NeuN (Figura 3).

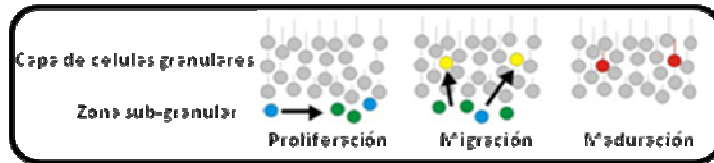


Fig. 2. Secuencia que siguen las nuevas células desde su generación en la zona sub granular, seguida por su migración hacia la capa de células granulares donde finalmente se diferencian e integran a la circuitería como células maduras (Modificada de von Bohlen 2007).

Supervivencia: un aspecto fundamental de la neurogénesis es que la nueva célula generada y diferenciada sobreviva. Para detectar esta parte del proceso, la estrategia experimental generalmente empleada es inyectar al animal con BrdU y sacrificarlo varias semanas o meses después para evaluar si la célula que se marcó aún está presente. El problema técnico que se puede encontrar es que se ha reportado que el marcaje de BrdU se pierde en la tercera división de la célula (Nowakowski et al., 1989) por lo cual se puede subestimar el número total de células que sobrevivieron.

Integración y estados de diferenciación.

Además de identificar la proliferación, diferenciación y supervivencia de las nuevas células, en los últimos años se han desarrollado técnicas muy detalladas que han permitido hacer una descripción funcional y morfológica de las células precursoras del hipocampo las cuales, que hasta hace unos años se desconocían (Fukuda et al., 2003; Fillipov et al., 2003; Kronenberg et al., 2003; Brandt et al., 2003). Para este análisis se ha empleado ratones transgénicos que expresan la proteína verde fluorescente en las células positivas a nestina, un filamento intermediario expresado en la mayoría de las células precursoras neurales (Lendahl et al., 1990; Yamaguchi et al., 2000). El empleo de estos animales ha permitido establecer las propiedades electrofisiológicas de los precursores con lo cual se conocieron al menos dos tipos de células precursoras, la tipo-1 y la tipo-2 (Fukuda et al., 2003; Fillipov et al., 2003). Posteriormente, por medio de co-localizaciones con marcadores fluorescentes, se estudió qué tipo de marcadores expresaban estas células, lo que ha permitido proponer el modelo de desarrollo que sigue la NA planteado por Kempermann y colaboradores basado en la expresión a la baja y a la alta de marcadores específicos de estados de desarrollo (Kronenberg et al., 2003; Brandt et al., 2003; Kempermann et al., 2004). Brevemente, el modelo comprende la división asimétrica del precursor tipo-1, el cual comparte características con células de glía, éste da a lugar a una célula exactamente igual y a un precursor tipo-2 que es una célula indiferenciada de

la que se distinguen con base en la ausencia o presencia de la expresión de DCX en tipo-2a y tipo-2b. Estas células dan paso al precursor tipo-3 que ya es una célula diferenciada y empieza a expresar marcadores que sugieren el comienzo de su integración a la circuitería hipocampal (Figura 3).

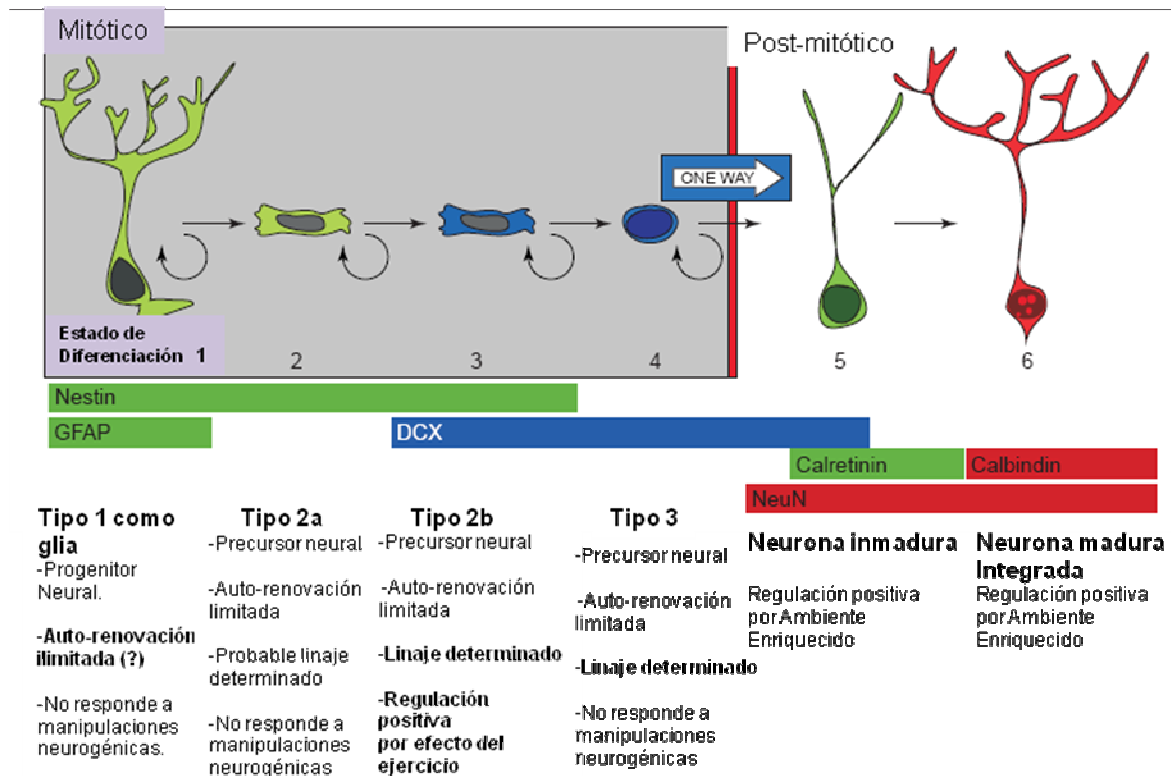


Fig. 3 Modelo de estados de diferenciación, dividido en 5 pasos, iniciando por la división del Progenitor neural tipo 1 que da a lugar por división asimétrica a una célula exactamente igual y a una célula tipo 2, la cual se divide en a y b por la ausencia o presencia de DCX, lo que sugiere la determinación del linaje, el precursor tipo 2b expresa DCX y es susceptible al efecto del ejercicio. El siguiente paso es precursor tipo 3 que da paso al estado post-mitótico donde la célula ya expresa marcadores de neurona y comienza su actividad. El último paso es la maduración e integración de la nueva neurona (Modificada de Kempermann et al 2004).

Muerte

Otro parámetro que se ha estudiado intensamente al respecto de la NA es la cantidad de nuevas células que mueren sin integrarse a la circuito hipocampal dado que una gran proporción de células generadas mueren tempranamente, por lo que se ha sugerido que estas células al no ser reclutadas a integrarse a la circuitería hipocampal, entran en apoptosis. Para identificar este parámetro se emplea la técnica de TUNEL y se cuantifica

cuántas células BrdU positivas co-localizan con células TUNEL positivas (Biebl et al., 2000; Petreanu y Alvarez-Buylla, 2002; Dayer et al., 2003; Kuhn et al., 2005).

4.4 Posible papel funcional de la neurogénesis adulta.

Desde su descripción en los años 60 el hecho de que se generen nuevas neuronas en el cerebro adulto ha sido de gran interés: ¿para qué se generan? ¿qué función tienen? En el caso de la neurogénesis del hipocampo estas preguntas tienen enorme relevancia puesto que es una región relacionada con procesos cognoscitivos. Por otra parte, el hipocampo es uno de los primeros blancos en la Demencia de Alzheimer. Por ello se ha planteado que la neurogénesis puede estar participando tanto en procesos fisiológicos, como patológicos, tal es el caso de la depresión. En este sentido resulta muy interesante el hecho de que los fármacos antidepressivos incrementan la neurogénesis (Santarelli et al., 2003; Sahay y Hen, 2007).

Otro aspecto importante es que se ha reportado que el daño en el hipocampo trae como consecuencia, deficiencias en algunos tipos de memoria (Shors et al., 2001). Dados estos antecedentes, las preguntas que surgen sobre el papel de la neurogénesis van en dos sentidos; uno es establecer qué papel tiene la neurogénesis en los procesos normales y patológicos del hipocampo. Segundo, definir si se puede tomar ventaja de la neurogénesis para subsanar las deficiencias de la función hipocámpal, ya sea posterior a lesiones, en estados patológicos o durante el envejecimiento normal donde se observa una disminución en el desempeño de las tareas relacionadas con esta región así como cambios morfológicos, entre ellos la disminución de la neurogénesis (Kuhn et al., 1996, Kronenberg et al., 2006).

Se ha demostrado que hay una relación entre la neurogénesis y la memoria, la disminución de las nuevas células se acompaña de un decremento en la ejecución de tareas de memoria (Shors et al., 2002) mientras que el incremento en la neurogénesis correlaciona con una mejor ejecución en dichas tareas (Kempermann et al., 1997; Nilsson et al., 1999; Shors et al., 2001). Sin embargo, la participación directa de las nuevas neuronas generadas en el hipocampo y su relación con los procesos de memoria sigue siendo controvertido, puesto que por una parte se ha propuesto que la neurogénesis es un regulador del proceso de consolidación de la memoria, aunque no de la memoria

espacial (Shors, et al., 2002), mientras que hay otros estudios que demuestran que las nuevas neuronas son necesarias en el procesamiento de este tipo de memoria (Dupret et al., 2008).

Otro aspecto interesante de la neurogénesis del hipocampo es que muestra lo que ha sido denominado regulación dependiente de la actividad (Kempermann 2002^a; Jessberger et al., 2003). Esto hace referencia a que el efecto de diversos estímulos ambientales regulan la generación e incorporación de las nuevas neuronas en el hipocampo. La importancia de esto radica en que, el incremento en la neurogénesis correlaciona positivamente con efectos en la ejecución de tareas de aprendidas, por lo que se ha propuesto el empleo de reguladores positivos para subsanar los déficits generados por la disminución de la neurogénesis a manera de intervención no farmacológica (Kronenberg et al., 2006).

A continuación mencionaremos algunos de los estímulos asociados a la neurogénesis y de qué manera la regulan.

4.5 Factores que regulan la neurogénesis.

La neurogénesis del hipocampo presenta una característica distintiva de la neurogénesis del la ZSV y es que, en respuesta a diferentes condiciones, muestra cambios en la cantidad de células que proliferan, en la diferenciación preferencial hacia un linaje determinado y en la cantidad de células que sobreviven. Entre los reguladores de la neurogénesis del hipocampo se pueden distinguir aquellos que lo hacen de manera positiva (estímulos que la incrementan) y los que la regulan de manera negativa (estímulos que la disminuyen).

4.5.1 Reguladores Negativos.

4.5.1.1 Efecto del envejecimiento en la neurogénesis.

El envejecimiento es el regulador negativo natural de la neurogénesis tanto en animales de laboratorio como en aquellos que viven en su hábitat natural (Kuhn et al., 1996, Cameron et al., 1999; Amrein et al., 2004). La NA presenta una disminución del 50% a los 9 meses y de un 17% a los 2 años en el ratón (Kronenberg et al., 2006) y está

disminución se acompaña de déficits en la ejecución de tareas de memoria que puede ser subsanada por las llamadas intervenciones neurogénicas como el ejercicio o el AE (Kempermann et al., 1998, Kempermann et al., 2002b).

4.5.1.2 Efecto de estrés en la neurogénesis.

El hipocampo es una región blanco de las hormonas relacionadas con el estrés. En este sentido se ha demostrado la presencia de receptores a esteroides adrenales en el hipocampo (McEwen et al., 1968; McEwen, 1999) y se ha reportado que el incremento de corticosterona disminuye la neurogénesis mientras que la adrenalectomía produce un incremento en la misma, por lo cual se ha sugerido una relación entre los niveles de circulación de corticosterona y el grado de neurogénesis (Cameron y Gould 1994). Otros estudios también han reportado que el estrés regula negativamente la proliferación celular, probablemente por el incremento de corticosterona que se observa en animales estresados (Gould et al., 1992; Gould et al., 1997; Lemaire et al., 2000).

4.5.2 Reguladores Positivos

Los reguladores positivos son estímulos que promueven un incremento en la neurogénesis del hipocampo, razón por la cual se les ha denominado también intervenciones neurogénicas (Kempermann et al., 2006) y se han propuesto como alternativas terapéuticas no farmacológicas para contrarrestar la disminución en la neurogénesis y las deficiencias funcionales que genera esta disminución. A continuación comentaremos las dos más empleadas.

4.5.2.1 Actividad Física Voluntaria

Uno de los moduladores positivos de la neurogénesis es el ejercicio físico, el cual promueve principalmente un incremento en la proliferación celular (van Praag et al., 2000). El correr en una rueda sin fin de manera voluntaria produce una mejoría en el desempeño de tareas de aprendizaje e incrementa la neurogénesis en ratones jóvenes (van Praag et al., 1999; Churchill et al., 2002; Kramer et al., 2006). En animales viejos se ha demostrado su eficacia para prevenir la disminución de la neurogénesis asociada a la edad y mejorar el desempeño en tareas conductuales (van Praag et al., 2005; Kronenberg et al., 2006). El ejercicio promueve la división de los precursores tipo- 2b pero no la integración y supervivencia de las nuevas neuronas; de esta manera solo una

pequeña cantidad de las nuevas neuronas generadas por efecto del ejercicio se integran a la circuitería del hipocampo por lo que se sugiere que un estímulo adicional pudiera ser necesario para reclutar a las nuevas células (van Praag et al., 2000, Kronenberg et al., 2003; Kronenberg et al., 2006). Aunque el mecanismo por el cual el ejercicio físico tiene un efecto positivo sobre la neurogénesis puede ser complejo, al parecer el incremento del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF por sus siglas en inglés) puede desempeñar un papel primordial (Fabel et al., 2003).

4.5.2.2 Ambiente Enriquecido (AE)

Como se mencionó al principio, el (AE) es una condición ampliamente utilizada para inducir cambios fisiológicos que resultan en un beneficio para el sujeto en varios aspectos y particularmente en el desempeño de tareas conductuales (Will et al., 1977; Renner MJ y Rosenzweig MR 1986; van Praag et al., 2000). En el caso de animales de laboratorio, se considera un AE una condición que, con respecto a las condiciones normales de alojamiento provee de una estimulación sensorial, social y física importante. Se ha propuesto que el efecto del AE se debe al reto que se le presenta al sujeto al estar expuesto a la novedad y complejidad del sistema, siendo la variación en el NA una respuesta adaptativa (Kronenberg et al., 2003; Kempermann et al., 2004; Kempermann 2006). El AE comprende la ejecución de diversas actividades como: explorar, ejercicio voluntario, exposición a objetos novedosos que inducen estimulación sensorial múltiple e interacción social. El paradigma experimental consiste en cajas en las cuales los animales tienen suficiente espacio para moverse libremente, hay túneles, aparatos para hacer ejercicio (rueda sin fin), diversos juguetes y todo se pone en distinta posición cada día para proporcionar elementos novedosos.

Se ha demostrado que la exposición a un AE promueve la neurogénesis en el hipocampo, sobre todo supervivencia, diferenciación e integración de las nuevas células (Kempermann et al., 1997; van Praag et al., 2000, Kronenberg et al., 2003), este efecto va acompañado de mejoras en el desempeño de tareas de memoria (Kempermann et al., 1998; Frick et al., 2003; Bennett et al., 2006). Aunque se ha establecido que el AE promueve un incremento en la neurogénesis, poco se ha estudiado el impacto que tiene el nivel de actividad que el sujeto tiene durante la sesión en los efectos promovidos por el AE. En nuestras observaciones vimos que los animales que integran las comunidades no despliegan el mismo número de conductas dentro del AE, de tal manera que hay animales que tienen mayor actividad durante la sesión que otros. Esto nos llevo a preguntarnos si la

regulación promovida por el AE sería igual en los animales con un mayor nivel de actividad que en los que están menos activos. Por otra parte nos preguntamos si el grado de ansiedad estaría relacionado a estas variaciones por lo cual lo medimos mediante pruebas conductuales y registrando los niveles de hormonas relacionadas a estrés.

Por otra parte, el AE contrarresta la disminución de la neurogénesis observada en el envejecimiento y previene del declive de la ejecución de tareas de memoria (Kuhn et al., 1996; Kempermann et al., 1998). El efecto del AE en el envejecimiento ha sido probado en protocolos agudos, pero se ha estudiado poco si la exposición a un AE iniciando en una etapa temprana y por un periodo prolongado de tiempo previene la disminución natural de la neurogénesis. Por ello nos preguntamos qué efecto tendría en el envejecimiento el exponer a ratas al AE desde los 3 meses de edad y por 18 meses.

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

5.1 Problema 1

Entre los animales expuestos a AE se observan diferencias en nivel de actividad. Definimos el nivel de actividad como el número de conductas desplegadas durante la sesión de AE, ¿estas diferencias influirán el efecto del AE sobre la proliferación celular en el hipocampo de estas ratas?, ¿habrá relación entre el grado de ansiedad de los animales y el nivel de actividad en el AE?.

5.2 Problema 2

El ambiente enriquecido tiene efectos favorables en el envejecimiento natural, sin embargo la mayoría de los protocolos probados han sido agudos, ¿cuál es el efecto de la exposición a un ambiente enriquecido a lo largo de la vida sobre la neurogénesis y el desempeño en pruebas de memoria en el envejecimiento?

VI. OBJETIVOS

6.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL 1

- a) Determinar si hay diferencias entre los individuos que integran la comunidad expuesta al AE con respecto al nivel de actividad que despliegan en éste.
- b) Determinar el grado de ansiedad que cada individuo presenta mediante pruebas conductuales.
- c) Determinar si hay relación entre el nivel de actividad y los niveles de hormonas relacionadas al estrés.
- d) Determinar si hay relación entre el nivel de actividad y los niveles de testosterona como marcador fisiológico del nivel de actividad.
- e) Determinar si hay relación entre el nivel de actividad y la proliferación celular del hipocampo.
- f) Determinar si hay relación entre el nivel de actividad y la expresión de DCX, como indicador de neurogénesis.

6.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL 2

- a) Exponer a ratas Wistar Macho a 18 meses de AE iniciando a los 3 meses de edad.
- b) Determinar por la ejecución de la prueba de reconocimiento de objetos si la exposición crónica al AE previene el deterioro cognitivo reportado en el envejecimiento.
- c) Determinar si la exposición crónica al AE previene el decaimiento de la neurogénesis asociado a la edad.
- d) Determinar si la exposición crónica al AE induce cambios en la expresión de sinaptofisina en ratas de 21 meses de edad.
- e) Determinar si la exposición crónica a AE tiene efectos en la morfología sináptica en ratas de 21 meses de edad.

VII. MATERIALES Y METODOS

7.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL 1

Sujetos: Se utilizaron 30 ratas Wistar macho de tres meses de edad (220-230 gr) que fueron alojadas en comunidades estables de grupos de cinco ratas por caja en el mismo cuarto con ciclo invertido (8:00 am) en condiciones habituales de laboratorio y provistos de alimento y agua *ad libitum*. Todos los animales fueron manipulados con las precauciones necesarias para minimizar el número de animales empleados y su sufrimiento, con aprobación del Comité de Ética y de la Comisión del Bioterio del IIB de la UNAM. Los grupos se manejaron de la manera siguiente:

Grupo experimental: (n= 20) los sujetos fueron expuestos al AE en grupos de cinco ratas cada uno. Fueron evaluadas conductualmente para medir el nivel de actividad y de ansiedad. Al día 13 de AE se les aplicó BrdU como se describe adelante. Posteriormente las ratas fueron sacrificadas, se tomaron las muestras de suero para las mediciones hormonales y se evaluó la proliferación celular mediante inmunohistoquímica.

Grupos Control: (n= 10) las ratas estuvieron expuestas a las mismas manipulaciones que el grupo experimental, excepto que estas no se expusieron al AE. Las ratas fueron analizadas para mediciones de ansiedad, inmunohistoquímica para BrdU y DCX así como mediciones hormonales.

Ambiente Enriquecido: siete días después de la inversión de ciclo los sujetos experimentales fueron colocados por comunidades estables de 5 ratas durante dos horas diarias dentro de la hora de mayor actividad por 15 días consecutivos. El ambiente enriquecido consistió en una caja de 0.70m x 0.50 x 0.22m en donde se colocaron diferentes objetos tales como: túneles de plástico, pelotas, cascabeles y una rueda sin fin (van Praag et al., 2000). Todos estos elementos fueron colocados en diferente posición cada día. En este complejo ambiental los animales tienen oportunidad de tener interacción social, conductas de exploración, exposición a ambientes novedosos y ejercicio voluntario.

Registro conductual: Para registrar los niveles de conducta desplegada en el AE se diseñó el siguiente protocolo: en los primeros siete días de AE, durante los primeros 30 minutos de exposición, se realizó un registro anecdótico en el cual se registraron las conductas de exploración, actividad física voluntaria e interacción social, las cuales fueron

definidas operacionalmente como se muestra en la Tabla 1. Por cada emisión de conducta de cada animal se marcaba con un punto. Los resultados se reportaron como el promedio de la puntuación que cada sujeto obtuvo y se agruparon en tres categorías según el grado de actividad desplegada como sujetos con alta, media y baja actividad (altos, medios y bajos).

Tabla 1: Definición de conductas registradas para determinar el nivel de actividad observado en el grupo experimental durante la sesión de AE.	
Categoría Conductual	Definición Operacional
Exploración	<ul style="list-style-type: none"> • Sostenerse sobre las patas traseras moviendo bigotes. • Tocar con las patas delanteras de manera sucesiva. • Olfatear. • Mordisquear.
Actividad física	<ul style="list-style-type: none"> • Correr. • Trepar. • Rodar la banda sin fin. • Saltar de una caja a otra.
Interacción social	<ul style="list-style-type: none"> • Olfatearse. • Treparse una encima de otra. • Seguirse. • Transportar objetos en equipo.

Prueba de campo abierto: es un modelo para registro del nivel de ansiedad en el cual se coloca al roedor en un campo novedoso y relativamente grande y se mide la distancia recorrida (número de cuadros avanzados). Se ha observado que los animales menos ansiosos presentan más locomoción y cruzan más veces el centro del campo abierto. El modelo consiste en una tabla de 1X1m de color negro, con cuadros marcados con líneas en color blanco de 20 X 20cm y una pared de madera de 20cm de alto rodeando el campo (Green y Hodges, 1991). Se coloca al animal en medio del campo con luz por 5min. La locomoción se mide contabilizando los cuadros avanzados y los cruces que hace en diagonal. La prueba se aplicó al día 5 de ambiente enriquecido, el grupo control fue evaluado el mismo día. Se transportó a los animales a una sala de registro especial

cuidando no exponerlos a la luz antes del momento de la prueba. La prueba se realizó siempre a la misma hora y en las mismas condiciones de manipulación para todos los grupos.

Laberinto elevado: esta prueba pertenece al grupo de pruebas que emplean conductas determinadas filogenéticamente para medir componentes de ansiedad. Consiste en un tablado elevado 50 cm arriba del suelo en forma de cruz con dos brazos cerrados (50 cm x 10 cm x 40) y dos brazos abiertos (50 cm x 10 cm). Está basado en la aversión natural de las ratas a los espacios abiertos y altos. En esta prueba se registra el tiempo (en segundos) que la rata pasa en la parte de brazos abiertos y el número de cruces que hace entre la sección de brazos abiertos y cerrados durante los cinco minutos de la prueba, se considera que una rata menos ansiosa pasará un mayor tiempo explorando la sección de brazos abiertos (Green y Hodges, 1991). Se aplicó al día 10 de exposición a ambiente enriquecido (n= 20) y el mismo día se le aplicó al grupo no enriquecido a (n= 10) en una habitación diferente a la del alojamiento con luces encendidas y las mismas condiciones de manipulación para ambos grupos.

Conducta de enterramiento: consiste en confrontar a las ratas a un estímulo adverso, en este caso un choque eléctrico no doloroso (3mA). Al día 13 del AE los grupos control y experimental fueron transportados cuidadosamente para que no recibieran luz y se llevaron a una sala en oscuridad para su evaluación, en esta sala fueron colocadas aleatoriamente una por una en el aparato que consistió en una caja de acrílico transparente (27 cm X 16 cm X 23 cm), la cual estaba cubierta con aserrín esparcido uniformemente. Debajo del aserrín se ocultó un electrodo bipolar de 7 cm conectado a un estimulador eléctrico (Grass Medical Instruments, Model 54JR, Quincy, MA) que se adhería a la pared de la caja. Al colocar a la rata en el aparato comienza a explorar la caja, por lo que se encontrará con el electrodo que le emitirá una pequeña descarga (3mA). La conducta a observar consiste en una serie de movimientos estereotipados de las patas delanteras y traseras dirigidos a cubrir con aserrín el sitio donde recibieron la descarga; se midió el tiempo que las ratas pasaron enterrando. Un animal más ansioso pasará más tiempo desplegando la conducta de enterramiento (Treit, 1985).

Inyecciones de 5-Bromo-2-deoxiluridina (BrdU) y preparación del tejido: con fin de examinar si había relación entre el nivel de actividad de las ratas en el AE y la proliferación celular en el hipocampo. Las ratas fueron inyectadas con *Bromo 5-deoxi-2-*

uridina (BrdU) (Sigma-Aldrich, St. Louis MO.), un análogo de timidina que se incorpora al DNA durante la fase de síntesis.

Las ratas de ambos grupos, control y experimental recibieron del día 13 al 15 de AE una inyección i.p. diaria de BrdU (100 mg/kg de peso disuelto en PBS). 24h después de última inyección las ratas recibieron una sobredosis de pentobarbital sódico i.p. y se perfundieron transcardialmente con 200 ml de solución salina 0.9% seguida por 150 ml paraformaldehído al 4% en buffer de fosfatos 0.1M para fijar el tejido, posteriormente se disecaron los cerebros y se dejaron en post-fijación por 24h. Se pasaron por gradientes de sacarosa (20 y 30%, 24h cada uno) finalmente se congelaron las muestras y se realizaron cortes coronales de 20 μ m en hipocampo.

Inmunohistoquímica para BrdU y DCX: rebanadas de 20 μ m se procesaron en libre flotación. Se bloqueó con suero de caballo 3% en Buffer de fosfatos 0.1M con 0.25% de Tristón X-100 (PBT) 24 h a 4°C; se retiró el sobrenadante y se agregó el anticuerpo primario contra BrdU 1:50 (kit Roche, Mannheim, Germany) en buffer de dilución que contiene en mM: Tris buffer, 66; MgCl₂, 0.66; 2-mercaptoetanol, (kit Roche, Mannheim, Germany) se incubó 48 hs a 4°C. Posteriormente se realizaron lavados con PBT 3X10 min y se agregó el anticuerpo secundario anti-mouse IgG 1:100 (Vector, Laboratories, Burlingame, CA) se incubó por 90 min a temperatura ambiente. Al cumplirse el tiempo de incubación se realizaron lavados con PBT 3x10 min y se incubaron las secciones en reagente ABC en PBS/BSA 5% por 1h a temperatura ambiente. Se lavó con PBS 3X10 y para la detección con peroxidasa; se empleó como cromógeno diaminobencidina (0.25 mg/ml diaminobenzidine, 0.01% H₂O₂, 0.04% NiCl), se lavaron las rebanadas con PBS 3X5; posteriormente se montaron en laminillas gelatinizadas y se analizó por microscopía de luz. Los controles negativos consistieron en eliminar el anticuerpo primario en los procedimientos.

Para analizar el número de nuevas neuronas generadas en el hipocampo llevamos a cabo la inmunohistoquímica contra doblecortina (DCX), que es una proteína de citoesqueleto de neurona joven que se expresa entre el día 12-16 post-mitótico por lo que consiste una manera eficaz para visualizar y cuantificar neurogénesis (Rao and Shetty, 2004; Couillard-Despres et al., 2005). Brevemente, rebanadas de 20 μ m en libre flotación se colocaron en una solución para eliminar peroxidasas endógenas que contenía 20% de metanol, 3% de Peróxido de Hidrógeno en PBT por 10min a T/A; posteriormente se hicieron lavados 3X10 PBS, y se incubaron toda la noche a 4°C en la solución de bloqueo que contiene 3% de

siero de caballo en Buffer de fosfatos 0.1M con 0.25% de Tristón X-100 (PBT). Se incubaron por 4h a T/A en anticuerpo policlonal anti-DCX (1:200) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) al término de esta incubación se realizaron lavados con PBT 3X10 y se incubaron por 1h a T/A en anticuerpo secundario anti-cabra (1:500) (Vector, Laboratories, Burlingame, CA). Para visualizar la reacción de peroxidación se empleó diaminobencidina como cromógeno.

Cuantificación de células BrdU positivas: el número total de células BrdU positivas en la zona subgranular (ZSG) y en la capa de células granulares (CCG) fue cuantificado en una de cada 15 secciones de 20 μ m (cada 300 μ m) en todos los animales. Las células positivas se contaron exhaustivamente usando el objetivo de 40X (Zeiss, Axioskop 40) . El número obtenido se multiplicó por 15 para obtener una estimación del número total de células por giro dentado.

Concentración de hormonas en plasma: los animales de ambos grupos recibieron una sobredosis de pentobarbital sódico i.p., se cortó la aorta y se colectó sangre de la misma después de anestesiarse al animal y previo al inicio de la perfusión. Otro grupo de ratas (Control n=4 y AE n=4) fue analizado sin usar anestesia. Las muestras se centrifugaron para separar los sueros, los cuales se colectaron con una pipeta pasteur, se almacenaron en alícuotas individuales y se congelaron a -4°C para la determinación por RIA de las hormonas. La determinación de Testosterona (T) y corticosterona (cort) fue realizada por radioinmunoensayo por duplicado en fase sólida de ^{125}I (Diagnostic Product Corporation, Los Angeles CA, USA). Para hormona adenocorticotrópica (ACTH) fue determinado por evaluación inmunoradiométrica (IRMA) (Diagnostic System Laboratories INC (Texas USA) en duplicado. La sensibilidad de la evaluación fue de 0.1 ng/ml para T, 4.29 ng/ml para cort y 6.0 pg/ml para ACTH. Los coeficientes de intra- e inter- evaluación de variación fueron 5.1 and 7%; 6.3 and 9.5%; and 4.8 and 8.0% respectivamente.

Análisis Estadístico: los datos son presentados en promedio \pm SEM. La comparación fue hecha por ANOVA Kruskal–Wallis, ANOVA seguida por Mann–Whitney U-test para calcular la probabilidad de los valores. El valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

7.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL 2

Sujetos: Se siguieron los mismos criterios del protocolo 1. Los grupos se manejaron de la manera siguiente:

Grupo experimental: (n= 20) los sujetos fueron expuestos al AE en grupos de cinco ratas cada uno. Después de 18 meses de AE se evaluó conductualmente su nivel de ansiedad y su desempeño en la prueba de reconocimiento de objetos. A los 21 meses de edad las ratas del grupo control y del grupo de AE se les aplicó las inyecciones de BrdU como se describe adelante; posteriormente fueron sacrificadas, se disecó el cerebro y se evaluó la proliferación celular mediante, los niveles de sinaptofisina y se realizaron preparaciones de sinaptosomas como marcadores de actividad en terminales sinápticas.

Grupos Control: (n= 10) las ratas estuvieron expuestas a las mismas manipulaciones que el grupo experimental, excepto que no se expusieron al AE. Las ratas fueron analizadas para mediciones de ansiedad, memoria e inmunohistoquímica para BrdU y DCX así como sinaptofisina y preparaciones de sinaptosomas.

Ambiente Enriquecido: se siguieron los mismos criterios que en el protocolo 1, hasta la segunda semana donde modificamos el protocolo ya que en nuestras dado que observamos una disminución en la interacción con el AE decidimos exponer a las ratas por 3h un día a la semana para evitar la habituación, las sesiones se llevaron a cabo por 18 meses consecutivos.

Memoria de reconocimiento de objetos novedosos: la prueba de reconocimiento de objetos novedosos es un modelo que permite examinar la habilidad de las ratas para discriminar entre los objetos novedosos y aquellos previamente encontrados. Se basa en la conducta de exploración que los roedores emiten de manera natural: los animales exploran preferentemente aquellos objetos que les resulten novedosos; si no recuerda que un estímulo le fue presentado con anterioridad lo exploraran de igual manera que uno nuevo (Ennaceur & Delacour, 1998). Después de 18 mese de AE las ratas del grupo control y experimental fueron evaluadas con esta prueba, para ello media hora antes de la hora habitual de la sesión de AE las ratas fueron transportadas cuidadosamente hacia una sala de observación la cual estaba en obscuridad y con temperatura controlada. Las ratas fueron colocadas individualmente en una caja de plástico opaco de las mismas dimensiones que las empleadas para el AE. Inicialmente cada una fue colocada aleatoriamente en la caja sin objetos por 5min para habituar a los animales al espacio;

24h después las ratas fueron colocadas en la caja por 5min, en esta sesión dos objetos equidistantes e igualmente atractivos fueron pegados en el piso de la caja para evitar su movimiento. Se registró el tiempo que las ratas pasaron explorando cada objeto durante los 5 min de la prueba. 24h después se llevó a cabo la fase de retención en la cual uno de los objetos fue reemplazado por un objeto con la misma forma y uno completamente novedoso, se cuantificó el tiempo que los animales pasaron explorando el objeto conocido y el novedoso. Para eliminar los estímulos olfativos los objetos eran cuidadosamente limpiados entre cada prueba. Para analizar la preferencia de exploración al objeto novedoso (el reconocimiento del objeto) fue utilizado el índice de exploración calculado de acuerdo a Clark et al., (2007) el cual se obtiene con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Tiempo total de exploración del objeto novedoso}}{\text{Tiempo total de exploración del objeto conocido} + \text{Tiempo total de exploración del objeto novedoso}} \times 100$$

Un índice de exploración >50% indica la preferencia para explorar preferentemente el objeto novedoso.

Prueba de campo abierto: esta prueba se aplicó para determinar si existían diferencias entre los grupos con respecto a la conducta de exploración y también como un indicador de ansiedad. Los ambos grupos de ratas viejas (21 meses de edad) expuestas al tratamiento crónico de ambiente enriquecido y el grupo control fueron evaluadas a los 18 meses de iniciar el tratamiento. Se aplicó el mismo protocolo que empleamos antes (Leal-Galicia et al., 2007), brevemente, el modelo consiste en una tabla de 1X1m de color negro, con cuadros marcados con líneas en color blanco de 20 X 20cm y una pared de madera de 20cm de alto rodeando el campo (Green y Hodges, 1991). Se coloca al animal en medio del campo con luz por 5min, la locomoción se mide contabilizando a mano los cuadros avanzados y los cruces que hace en diagonal, los cruces en el centro indican menos ansiedad mientras que los animales más ansiosos tienden a moverse en el centro de la arena. Para su evaluación se transportó a los animales a una sala de registro especial cuidando no exponerlos a la luz antes de el momento de la prueba. La prueba se realizó siempre a la misma hora y en las mismas condiciones de manipulación para todos los grupos.

Inyecciones de 5-Bromo-2-deoxiluridina (BrdU) y preparación del tejido: se siguió el mismo protocolo que describimos anteriormente.

Inmunohistoquímica para BrdU y DCX: se siguió el mismo protocolo que descrito anteriormente.

Cuantificación de células positivas a BrdU y DCX: las rebanadas de cerebro fueron analizadas por microscopía de luz, las células positivas a BrdU y DCX se contaron en el giro dentado en ambos hemisferios empleando un objetivo de 40X (Zeiss, Axioskop 40X) a lo largo de la porción rostrocaudal del hipocampo. El número de células positivas en la zona subgranular (ZSG) y en la capa de células granulares (CCG) se contaron cada 6 secciones de 30 μ m (cada 180 μ m) en todos los animales. Para obtener el estimado estereológico la densidad de las células inmunopositivas se calculó dividiendo el número de células marcadas entre el volumen de la sección, luego el número obtenido por densidad celular fue multiplicado por el volumen de referencia que se determinó por la suma de las áreas de la ZSG y CCG multiplicado por la distancia entre las secciones (180 μ m).

Cuantificación de niveles de sinaptofisina en hipocampo: el hipocampo fue disecado y resuspendido en buffer de lisis que contenía 50mM Tris, 1% NP-40 y 0.5% DOC así como un cocktail de inhibidores de proteasas (Complete, Roche). Las muestras fueron sonicadas y centrifugadas por 1 hora a 14,000 rpm. 50 μ g de proteína de cada muestra fue cargado en 10% de SDS-PAGE. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon en 5% de leche descremada en PBS por 2h a temperatura ambiente, posteriormente se incubaron por 48h a 4°C en anticuerpo primario (anticuerpo monoclonal anti-sinaptofisina, 1:500 Santa Cruz Biotechnology). Al terminar la incubación se lavaron con PBS con 0.1% Tween, después fueron incubados con anti-mouse IgG acoplado a peroxidasa (1:10,000, Santa Cruz Biotechnology). Las bandas Inmunoreactivas fueron detectadas con quimioluminiscencia (ECL system, Amersham, IL, USA). La intensidad de las bandas se cuantificó por densitometría. Las bandas se escanearon con Fluor FS y se analizaron con el programa Quantity one 4.4.1 (BioRad). Los valores de la densitometría se normalizaron con respecto con los obtenidos con anticuerpo monoclonal anti- α -tubulina (1:500, Sigma–Aldrich,USA).

Sinaptosomas: se utilizaron ratas macho Wistar, jóvenes de 3 meses de edad y viejas entre 18-20 meses. El hipocampo se disecó en hielo y fue homogenizado en una solución de sacarosa 0.32M. Los sinaptosomas se obtuvieron por medio de centrifugaciones diferenciales en gradientes de sacarosa (Löscher et al., 1985). El pellet que corresponde a la fracción sinaptosomal, se resuspendió en un buffer de Locke pH 7.2 (NaCl 154mM, KCl 5.6mM, CaCl₂ 2.3mM, MgCl₂ 1mM, NaHCO₃ 3.6mM, glucosa 5mM, hepes 5mM). Posteriormente, se tomaron alícuotas de 200 μ l que corresponden a una concentración de proteína de 50 μ g.

Análisis Estadístico: los datos se presentan como promedio \pm SEM. La comparación fue hecha con Student's t-test no pareada para calcular valores de probabilidad. El valor de $p < 0.05$ fue considerada como significativa.

VIII. RESULTADOS

Exposure to Environmental Enrichment Elicits Differential Hippocampal Cell Proliferation: Role of Individual Responsiveness to Anxiety

Perla Leal-Galicia,¹ Alfredo Saldívar-González,² Sumiko Morimoto³
Clorinda Arias¹

¹ Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70228, 04510 México D.F., México

² Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México AP 70297, 04510 México D.F., México

³ Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición, 14000 México D.F., México

Received 13 September 2005; revised 5 July 2006; accepted 6 July 2006

ABSTRACT: Environmental enrichment (EE) is a largely employed behavioral procedure in which animals are exposed to high stimulation compared with conventional housing conditions. Animal exposure to an EE exerts beneficial effects on the performance of different learning tasks and induces a number of behavioral, neurochemical, and neuroanatomical changes including hippocampal cell proliferation. However, the importance of voluntary interaction with the environment in these changes has not been clearly resolved yet. Moreover, the effects of a complex environment on animal emotionality still remains questionable and has not been explored in detail under conditions that allow unmasking individual

responses among subjects in a group. The present study was aimed at exposing groups of rats to an EE, and analyzing individual differences in activity levels during EE sessions. We observed differences with respect to the activity level displayed by rats during the enriched sessions, which correlated with differences in the rate of hippocampal cell proliferation. It is suggested that exposure to EE may reduce anxiety-like behaviors and may elicit individual differences on emotional reactions positively linked with hippocampal neurogenesis and testosterone levels. © 2007 Wiley Periodicals, Inc. *Develop Neurobiol* 67: 395–405, 2007
Keywords: anxiety; cell proliferation; environmental enrichment; neurogenesis; testosterone

INTRODUCTION

Neurogenesis in the hippocampal formation has been demonstrated throughout the lifetime of multiple species including humans (Altman and Das, 1965; Gage,

2002; Gould and Gross, 2002; Jin et al., 2004). However, at present, the mechanisms underlying this phenomenon and the functional role of the newly generated cells remain unknown. Substantial experimental evidence suggests that some conditions can modulate cell proliferation in the hippocampus. Among others, it has been fully documented that animal exposure to enriched environments (EE) induces an increase in the number of new neurons in the hippocampus by a mechanism not well known (Kempermann et al., 1997; van Praag et al., 2000).

Correspondence to: C. Arias (carias@servidor.unam.mx).

Contract grant sponsor: Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT); contract grant number: IN205403.

© 2007 Wiley Periodicals, Inc.

Published online 24 January 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DOI 10.1002/dneu.20322

The EE is a largely employed behavioral situation in which animals receive more stimulation in relation to conventional housing conditions. Animal exposure to EE consists in housing groups together in a large complex cage with various toys where animals have the opportunity to display social interaction, voluntary exercise, and exploratory behaviors (Rosenzweig, 1966). The beneficial effects of exposure to EE have been associated with better cognitive performance in learning and memory tasks and also with an increase in the proliferation, survival, and differentiation into neurons of new generated cells in the dentate gyrus (Kempermann et al., 1997; Nilsson et al., 1999; van Praag et al., 1999; Bruel-Jungerman et al., 2005). Measures of improvement of the above-mentioned effects are usually designed to minimize intra-group variability. However, multifaceted brain processes linked with individual differences may be differentially activated during the behavior displayed in the EE sessions, which comprise exercise, visual, social, and spatial stimuli.

In the present study we explored changes in hippocampal cell proliferation of rats exposed to an EE, and to non-enriched housing conditions and evaluated the correlation between 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU)-positive cells and anxiety levels in both groups. We also visualized cells that were positive for doublecortin (DCX) as a marker of new neurons and explored the role of social hierarchy and the level of activity displayed during EE sessions by individuals as well as variations in testosterone and in stress-related hormones: adrenocorticotrophic (ACTH) and corticosterone (COR).

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Thirty three-month old male Wistar rats (220–230 g) were housed in groups of five rats per cage in conventional laboratory housing conditions in the same room with inverted light/dark cycle (8:00 am lights off) and provided with food and water *ad libitum*. All animals were handled with the necessary precautions to minimize the number of used animals and their suffering, in agreement with institutional and international guidelines. Different experimental groups were formed as follows:

Experimental rats ($n = 20$) were exposed to EE conditions in groups of five rats; rats were grouped according to the level of activity displayed in the EE sessions (see Behavioral record) before being subjected to the anxiety tests. Control rats ($n = 10$) were kept in conventional laboratory conditions.

Table 1 Behavioral Evaluation During Environmental Enrichment

Behavioral Category	Operative Definition
Exploration	–Rearing
	–Touch any object with two paws simultaneously
	–Sniffing
	–To pry into
	–To nibble at
Physical activity	–Run inside the cage
	–Climbing
	–Jumping in the cage
Social interaction	–Sniffing each other
	–Jumping on each other's back
	–Chasing each other
	–Transport objects in team

Enriched Environment

Seven days after the rats were adapted to light/dark cycle inversion, the experimental subjects were placed in groups of five rats per cage under EE, 2 h daily for 15 consecutive days. EE consisted of a large cage (0.70 m × 0.50 m × 0.22 m) containing different elements such as plastic tunnels, little plastic balls, small bells, and a running wheel (van Praag et al., 2002). These elements were placed in different positions every day. In this complex environment the animals had the opportunity to display social interaction, exploratory behavior, and voluntary physical exercise.

Behavioral Record

To analyze activity levels among animals during exposure to EE, we categorized individual animals with respect to three different displayed behaviors: social interaction, exploration, and physical activity. The operative definition of these three behavior categories is shown in Table 1. A record of the individual activity level was obtained by analyzing the behavior of each rat during the first 30 min of exposure to the EE every day during the first week, and a point was allotted each time the animal displayed any of the defined behaviors. Results are reported as the mean of the total points obtained by each rat, and grouped in three categories as low, medium, and high activity.

Behavioral Anxiety Analysis

For evaluation of anxiety, animals were submitted to the EE session every day as described above, and after 5 and 10 days animals were placed in two anxiety paradigms: open field (day 5) and elevated plus maze (day 10) (Fig. 1 for experimental design). Animals housed in standard conditions were compared in parallel. In addition, we examined a separated group of animals exposed during 10 days to an

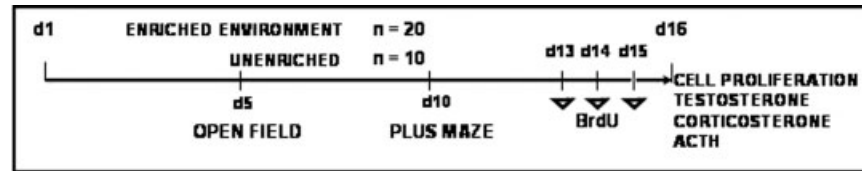


Figure 1 Timeline for experimental design showing number of animals submitted to each test. d, day.

enriched ($n = 20$) or non-enriched ($n = 10$) environment for anxiety through the defensive burying test, which does not involve locomotion.

Elevated Plus Maze

The elevated plus-maze test belongs to the family of anxiety models that explore phylogenetically determined behaviors. These models have been used for the development of putative anxiolytic compounds. Physically, the paradigm consists of a standard wooden plus-shaped maze, elevated 50 cm, with two 50 cm \times 10 cm \times 40 cm closed arms, and two 50 cm \times 10 cm open arms. The paradigm is based on the natural aversion of rats to open high places. In this test, the time the animal spends in the open arm section is recorded as well as the number of transitions the subject performs from one closed-arm section to another during a 5 min period (Lister, 1990). The test was composed of a single free exploration session lasting 300 s on day 10, immediately before the last EE session, and conducted during the light period of the day in a silent room.

Open Field

The open field paradigm is a fully validated animal model of anxiety that consists in placing rats in a novel and relatively large arena. The open field consists of a 1 m \times 1 m dark surface divided in 20 cm \times 20 cm squares that allow quantifiable locomotion registration (Green and Hodges, 1991). Exploration (locomotion) is recorded: high levels of locomotion indicate lack of anxiety, whereas anxious animals tend to stay in a confined region of the arena. On day 5 after exposure to the EE, rats were moved to a different bright room and each animal was independently placed in the center of the open field for 5 min; the number of squares crossed was recorded.

Defensive Burying

According to Treit (1985), the defensive burying test consists on confronting rats to an aversive stimulus (shock prod). The defensive behavior consists of a series of stereotyped movements of the forepaw and the entire body aimed at covering with fine sawdust an electrode placed on one wall of the cage trough which the animal receives, each time it is touched, a low non-painful electric shock of 0.3 mA. During the burying behavior test, animals were placed

for 10 min in an acrylic cage (27 cm \times 16 cm \times 23 cm). The electric shock was delivered from a stimulator (Grass Medical Instruments, Model 54JR, Quincy, MA) through a bipolar electrode, 7 cm in length, attached to the wall of the cage (Treit, 1985). On day 10 after exposure to the EE, rats were moved to a different room and, each animal was independently placed in the cage to evaluate defensive burying behavior. The cumulative time that each rat spent in defensive burying was analyzed and compared with control rats from a non-enriched environment.

5-Bromo-2-deoxyuridine Injection and Tissue Preparation

To examine whether the different activity displayed by rats during EE affected the number of new cells in the dentate gyrus, animals were injected with the thymidine analog bromodeoxyuridine (BrdU) (Sigma-Aldrich, St. Louis MO.) BrdU was dissolved in PBS. Experimental and control rats received 3 daily i.p injections (100 mg/kg of body weight) during the last 3 days spent in either the enriched or the non-enriched environment (Fig. 1). Twenty four hours after the last injection rats were deeply anesthetized with sodium pentobarbital and transcardially perfused with 0.9% saline followed by fixative (4% formaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4). Brains were removed and left in fixative for 24 h. They were then successively transferred to 20 and 30% sucrose (24 h each). Coronal sections (20 μ m) were cut in a cryostat and processed for immunohistochemistry.

BrdU and Doublecortin Immunohistochemistry and Quantification

Free-floating sections were incubated at 4°C overnight in blocking solution containing phosphate-buffered saline (PBS), 3% horse serum, and 0.25% Triton X-100 (PBS-TS). After removing the blocking solution, sections were incubated for 48 h at 4°C in anti-BrdU monoclonal antibody diluted 1:10 in the incubation buffer (kit Roche, Mannheim, Germany). At the end of this period, sections were rinsed 3 \times 10 min in PBS and incubated for 90 min at room temperature with an anti-mouse IgG (1:100) secondary antibody (Vector, Laboratories, Burlingame, CA). After rinsing the sections in PBS, ABC reagent was applied for 1 h, followed by peroxidase detection for approximately 5 min using diaminobenzidine as chromogen (0.25 mg/mL diaminobenzidine,

0.01% H₂O₂, 0.04% NiCl). Negative controls consisted of eliminating primary antibodies in the procedure.

To analyze newly generated neurons we performed DCX-immunohistochemistry, which is a reliable way to visualize and analyze modulation in the levels of neurogenesis, as has been detailed explored (Rao and Shetty, 2004; Couillard-Despres et al., 2005).

Briefly, 20 μ m free floating sections were blocked at 4°C overnight with blocking solution containing PBS, 3% horse serum and 0.25% Triton X-100 and incubated for 4 h at room temperature in anti-DCX polyclonal antibody (1:200) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). After this period the sections were rinsed in PBS 0.1M three times by 10 min and incubated in an anti-goat secondary antibody (1:500) (Vector, Laboratories, Burlingame, CA) 1 h. The peroxidase reaction was visualized using diaminobenzidine as the chromogen.

The total number of BrdU-positive cells in the subgranular zone (SGZ) and in the granule cell layer (GCL) was counted in every 15th section of 20 μ m sections (every 300 μ m) in all animals. Positive cells were counted using a 40 \times objective (Zeiss, Axioskop 40) along the rostrocaudal location of the hippocampus. Resulting numbers were multiplied by 15 to obtain an estimation of the total number of positive cells per dentate gyrus.

Plasma Hormone Concentrations

Control and experimental animals were deeply anesthetized with pentobarbital and blood samples were collected after cutting the aorta prior to perfusion. In a separate group of animals (control $n = 4$ and enriched $n = 4$) COR levels were determined by collecting blood from unanesthetized animals. The samples were centrifuged at room temperature and serum was collected with a pipette and stored at 4°C in individual aliquots. Testosterone and COR determinations were performed in duplicate by solid-phase ¹²⁵I radioimmunoassay (Diagnostic Product Corporation, Angeles CA). Adrenocorticotrophic hormone (ACTH) was determined by immunoradiometric assay (IRMA) (Diagnostic System Laboratories INC, Texas) in duplicate. The sensitivity of the assays was 0.1 ng/mL to testosterone, 4.29 ng/mL to COR, and 6.0 pg/mL to ACTH. The intra- and inter-assay coefficients of variation were 5.1 and 7%; 6.3 and 9.5%; and 4.8 and 8.0% respectively.

Statistical Analysis

Data are presented by mean \pm SEM. Comparisons were made by Kruskal–Wallis ANOVA followed by the Mann–Whitney U-test for calculating probability values. A p value < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Animal exposure to an EE differentially influenced the level of displayed activity (i.e social interaction,

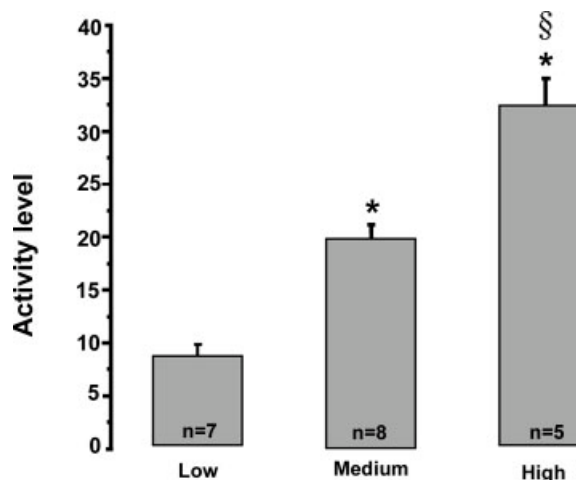


Figure 2 Activity level displayed during EE. Individual activity level is reported as the mean of the total points obtained by rats when displaying each behavioral category (see Table 1). The mean of the total points achieved by each rat in a period of 30 min during 1 week allowed to group animals into low, medium, and high. Results are expressed as mean \pm SEM of the number of animals depicted inside the bars. Mann–Whitney U-test, * $p < 0.05$; § $p < 0.05$ when compared high and medium groups.

exploration and physical activity) among subjects. The record of individual activity level during EE sessions is reported as the mean of total points that each rat obtained when displayed each behavioral category assigned as is shown in Table 1. The mean of total points reached by each rat in a period of 30 min during one week allowed categorizing the animals in “low”, “medium,” and “high display of activity” groups (Fig. 2). These differences in activity levels closely correlated with differences in anxiety-like behavior after exposure to an EE. After 5 days in the EE, rats were tested in the open field test. There was a major effect of housing on anxiety-like behavior: the EE animals crossed significantly more squares than the non-EE animals in the open-field test [Fig. 3(A)]. However, rats that displayed low activity levels in the EE showed lower locomotor activity reflecting higher anxiety levels, and, conversely, animals with medium or high level of activity in the EE crossed significantly more squares in the open field test. Two distinguishable groups of control rats housed in conventional non-EE situations were also observed with respect to anxiety levels [Fig. 3(B)].

Results in the elevated plus maze were similar to those obtained in the open field test: we registered significant differences in time spent in the open arms of the maze in rats exposed for 10 days to the EE, as compared with control rats [Fig. 4(A)], thus suggest-

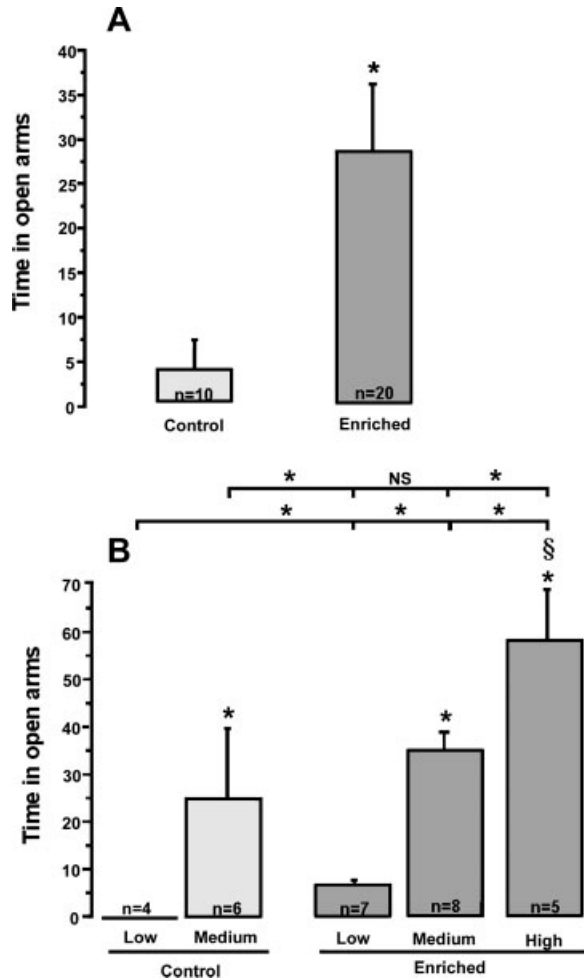


Figure 3 Effect of housing conditions on the open-field test. Animals were located in the center of the open field for 5 min and total number of crossed areas was counted. Rats exposed to EE showed significantly more crossed areas than non-EE animals (A). EE animals exhibited differential activity in the open field: rats that displayed high activity also exhibited more crossed areas with respect to rats grouped as medium or low. Two groups of control rats housed in standard conditions were also observed. (B) Results represent the mean \pm SEM of the number of animals included in each condition. Mann–Whitney U-test, * $p < 0.05$; § $p < 0.05$ when compared high and medium groups; NS = non-significant.

ing less anxiety in the EE group. Individual differences in anxiety were detected between subjects that displayed low, medium and high activity in the enriched condition, which inversely corresponded to anxiety levels [Fig. 4(B)].

In view that the plus-maze and the open field tests analyze anxiety from the exploratory behavior displayed in a novel situation, we included the defensive burying test that inferring anxiety trough the reduc-

tion of time spent in a specific activity. Animal exposed to EE showed lower levels of defensive burying compared with control rats [Fig. 5(A)]. In addition, individual differences were observed between rats, which displayed low, medium, or high activity during exposure to the EE that correlated with high, medium, and low defensive burying respectively [Fig. 5(B)].

To determine whether the observed differences among individual rats exposed to an EE with respect

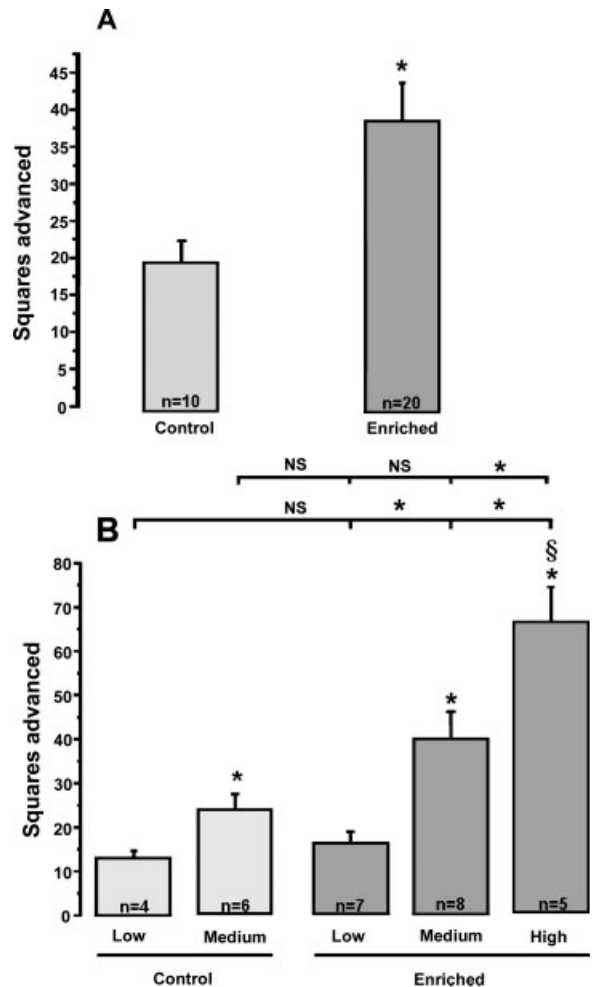


Figure 4 Effect of housing conditions on the elevated plus maze test. Animals exposed to EE spent significantly more time in the open arms than non-EE animals (A). Three distinguishable groups of rats displaying different activity during EE sessions were observed; rats with high activity level in the EE spent more time in open arms than animals with medium or low activity. Two groups of control rats housed in standard conditions were observed with respect to the time spent in open arms (B). Results are expressed as mean \pm SEM of the number of animals included in each condition. Mann–Whitney U-test, * $p < 0.05$; § $p < 0.05$ when compared high and medium groups; NS = non-significant.

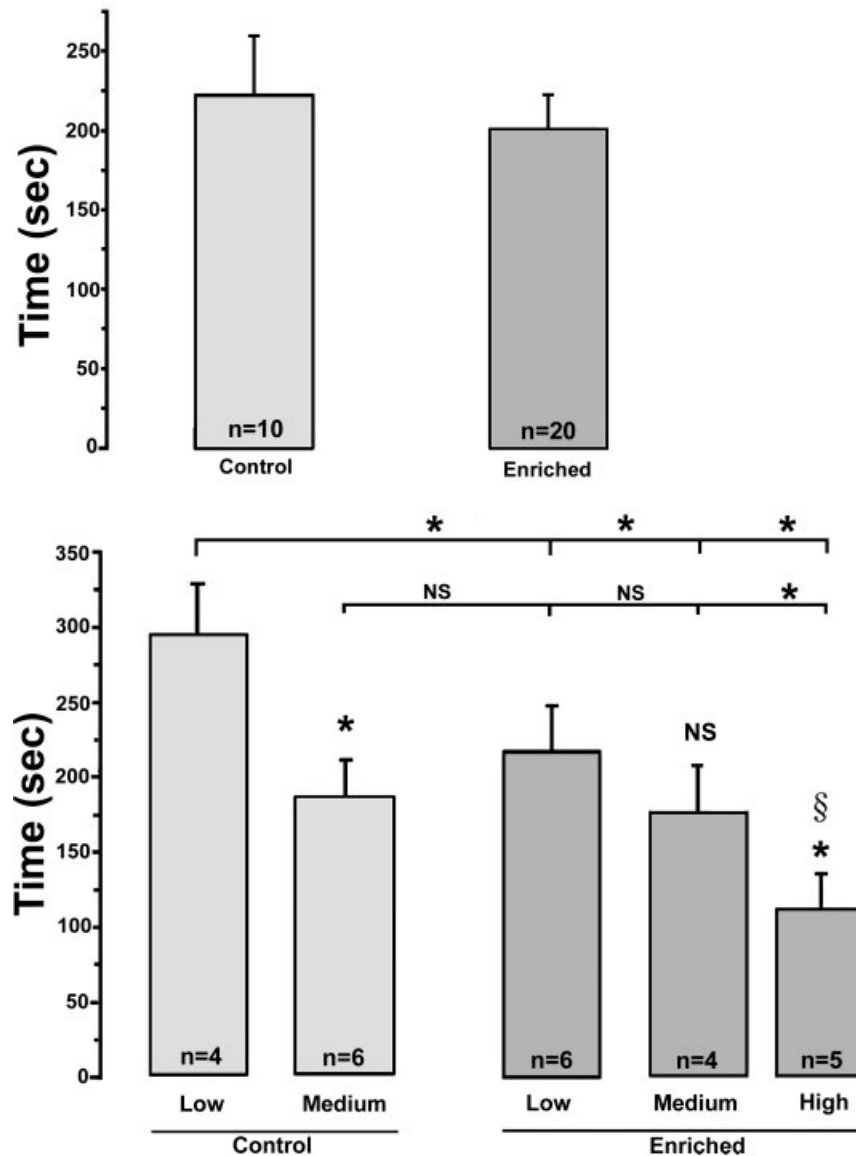


Figure 5 Effect of housing conditions on defensive burying test. Animal exposed to EE showed less cumulative burying than the non-EE animals (A). EE animals exhibited differential activity in the burying behavior: rats that displayed high activity exhibited less cumulative burying with respect to rats grouped as low (B). Results represent the mean \pm SEM of the number of animals included in each condition. Mann–Whitney U-test, * $p < 0.05$.

to activity levels and anxiety-like behavior were also reflected as changes in hippocampal cell proliferation, we studied the number of BrdU-labeled cells in the dentate gyrus (Fig. 6). The number of BrdU-positive cells among animals exposed to the EE (taken together as a group) was larger than in control animals (the difference between maximum numbers of BrdU-labeled cells in the enriched groups was 4215 ± 368 and in the control group it was 2420 ± 425). Differences between individuals exposed to the EE were also observed: rats with low activity levels had simi-

lar numbers of BrdU-labeled cells as control non-enriched subjects (2490 ± 344 compared with 2420 ± 425). A significant difference in BrdU-labeled cell number was observed between non-enriched rats and EE rats with low activity level, when compared with rats with medium level of activity (4650 ± 359) and rats with the highest displayed activity (5501 ± 606). DCX-positive neurons were typically found in the subgranular zone and at the border between subgranular zone and granular layer. Consistent with the BrdU immunohistochemistry, rats exposed to an EE

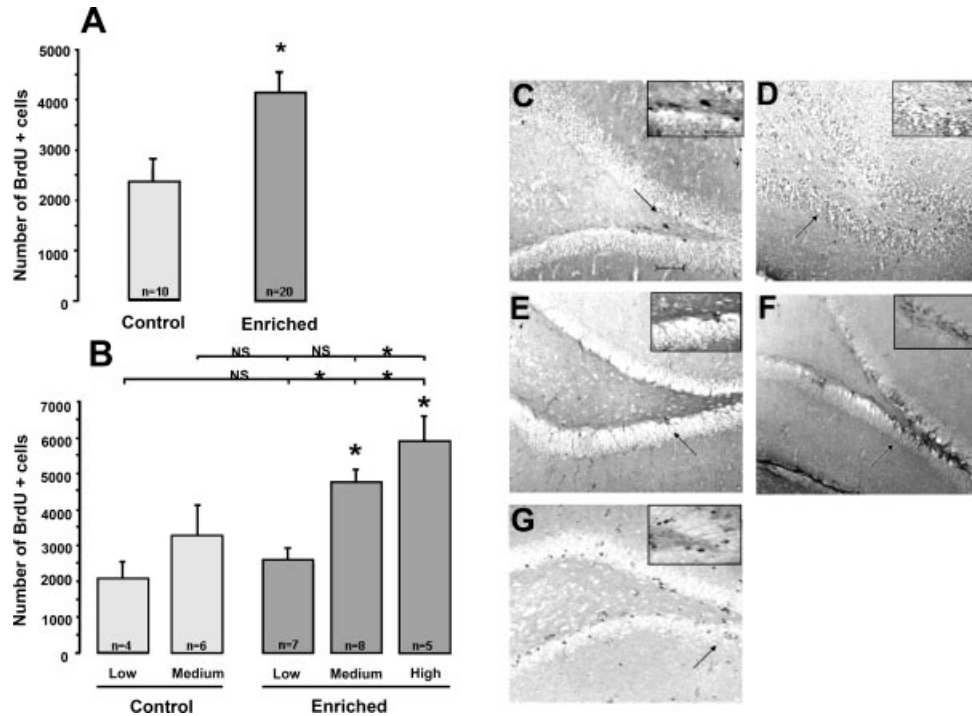


Figure 6 BrdU counts in the dentate gyrus of from EE and control animals (A, left panel). More BrdU-labeled cells were observed in the dentate gyrus from rats with high activity during EE session compared with medium or low activity groups. The low activity group showed similar number of BrdU-labeled cells as control animals (B, left panel). Representative micrographs of the dentate gyrus processed for BrdU immunohistochemistry in control rats with low or medium anxiety levels (C and D, right panel) and EE rats displaying low (E) medium (F) or high activity (G). Insets are higher magnification of the corresponding zones marked by arrows. Results represent the mean \pm SEM of the number of animals included in each condition. Mann–Whitney U-test, * $p < 0.05$; NS = non-significant. Scale bar = 50 μ m.

showed a greater number of new neurons [compare Fig. 7(A) with 7(D)]. Morphological analysis of DCX immunolabeled cells revealed that the new neurons had a more complex dendritic arbor from animals displaying the highest rate of activity during the EE sessions [compare Fig. 7(E) with 7(F)].

To examine whether differences in the level of activity displayed by animals in the EE correlated with endocrine markers of stress or testosterone, we measured basal blood-samples of ACTH, CORT, and testosterone at the end of the last EE session in the same individuals that were analyzed for anxiety and BrdU-labeled cells. Levels of circulating CORT [Fig. 8(A)] revealed small differences between EE and non-EE animals (181.8 ± 15.1 ng/mL and 228.4 ± 25.3 ng/mL, respectively and 126.74 ± 10.2 ng/mL and 175.2 ± 45 ng/mL from unanesthetized animals). Although differences were not statistically significant, we observed a tendency towards lower levels of CORT in animals exposed to EE. On the other hand, levels of ACTH [Fig. 8(B)] were similar in EE and non-EE

animals (108.7 ± 9 and 105.5 ± 19 pg/mL, respectively). Finally, testosterone levels were slightly higher in animals subjected to EE sessions (2.06 ± 0.5 compared with 1.62 ± 0.3 ng/mL) [Fig. 9(A)]. Interestingly, a positive relationship between circulating levels of testosterone and activity levels displayed in the EE session was found [Fig. 9(B)].

DISCUSSION

The main finding in this study is that EE substantially modifies anxiety-like behavior that correlates with individual differences in the rate of hippocampal cell proliferation and testosterone levels.

Many studies have shown effects of EE on brain plasticity and functioning. At cellular level, animals exposed to EE showed an increase in the proliferation, survival, and differentiation into neurons of new generated cells in the dentate gyrus (Kempermann et al., 1997; Nilsson et al., 1999; van Praag et al., 1999;

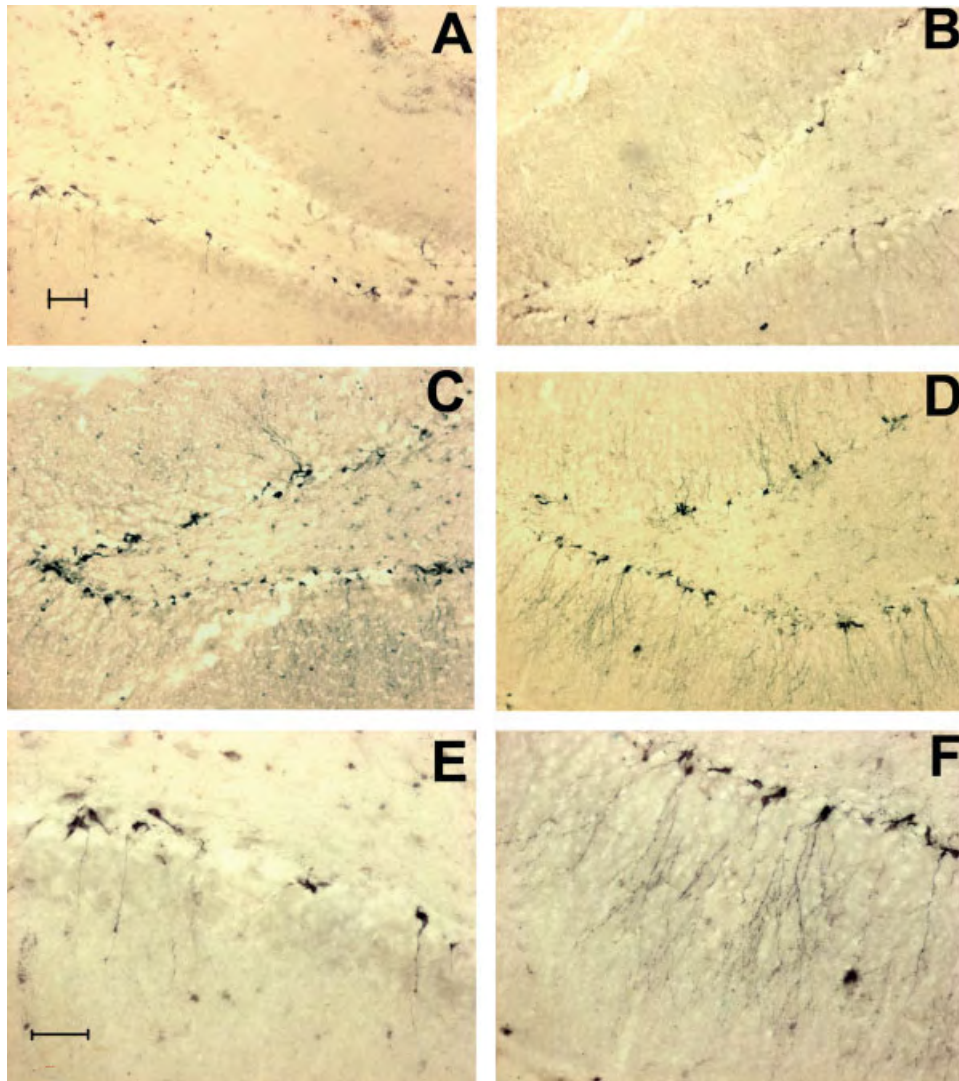


Figure 7 Light micrographs of DCX-immunolabeled new neurons from control, non-EE rats (A) and EE rats displaying low (B), medium (C) or high activity (D) after 10 days of exposure to an EE. A comparison of the morphology of DCX-positive neurons and their dendrites from a control rat (E) and from a rat that displayed high activity (F) is shown in high magnifications. Each micrograph is representative from three to seven rats. Scale bar = 50 μm .

Bruel-Jungerman et al., 2005). Moreover, animals housed in EE perform better in learning tasks compared with animals maintained in non-enriched environment (Renner and Rosenzweig, 1986; Mohammed et al., 1990) and show less behavioral stress (Fernández-Teruel et al., 2002; Larsson et al., 2002; Benaroya-Milshtein et al., 2004). An EE apparently affects the way in which animals cope with stress, although the differential impact of EE exposure on anxiety-like behaviors among subjects within a group had not been described to date. Various features of the EE may help to express and reinforce natural

behaviors that reflect individual differences as to how subjects contend with the environment and with other individuals. Differences in the performance of diverse behaviors displayed during the EE sessions may involve, among others, the establishment of a dominance hierarchy that induces social stress; different level of activity displayed by rats exposed to more stimuli in quantity and diversity, and/or differential responses to anxiety. To the best of our knowledge, this is the first study to show differential effects of enrichment on different aspects of the activity displayed by individuals, implying that neural outcomes

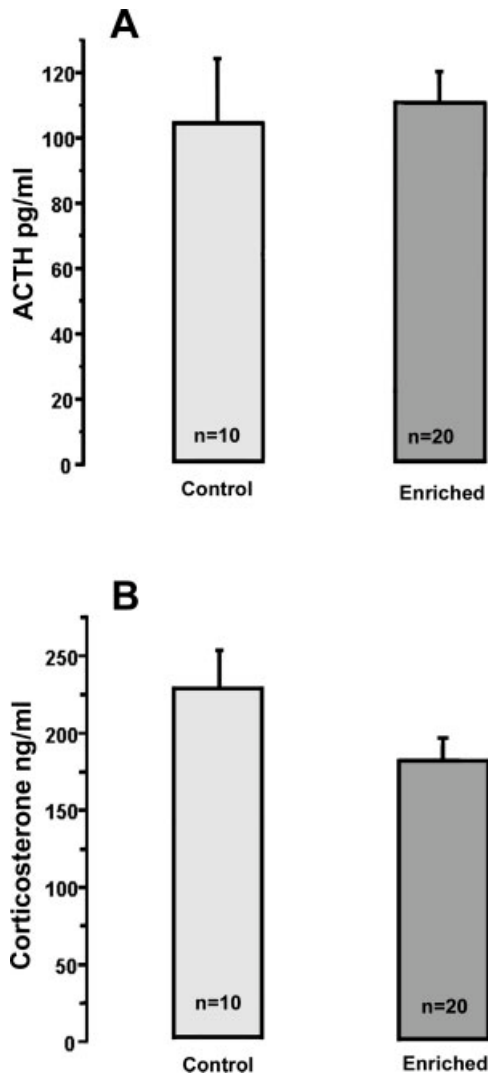


Figure 8 ACTH and COR plasma levels from EE rats and non-EE rats. ACTH and COR values did not differ between EE and non-EE animals although a slight decrease in COR was observed after exposure of animals for 10 days to the enriched condition. Bars represent mean \pm SEM of the number of animals included in each condition. Mann-Whitney U-test. * $p < 0.05$.

are a function of the degree and nature of environmental experience.

The degree of activity displayed by rats correlated positively with changes in anxiety-like responses analyzed by three different paradigms: the open field, the elevated plus maze, and the defensive burying behavior. All of these tests have been frequently used and are validated as paradigms that are sensitive to detect shifts in an animal's approach/avoidance-based conflict (File, 1990). Our results showed reduced anxiety-like responses in the open-field, in the elevated plus maze and in the defensive burying that inversely

correlated with the level of social interactions and of exploratory and motor behavior displayed in the EE. Interestingly, anxiety reduction was primarily indicated by an increase in a specific activity (open arms and plus-maze exploration) and by a decrease in a specific activity in the defensive burying test.

At present, the relationship between behavior and brain structure is not clear yet, but a role of the limbic system in the control of anxiety responses has been recognized (File et al., 2000). Interestingly, we established a correlation between changes in cell proliferation in the hippocampus and individual differences in emotionality after EE exposure: high rates of BrdU-

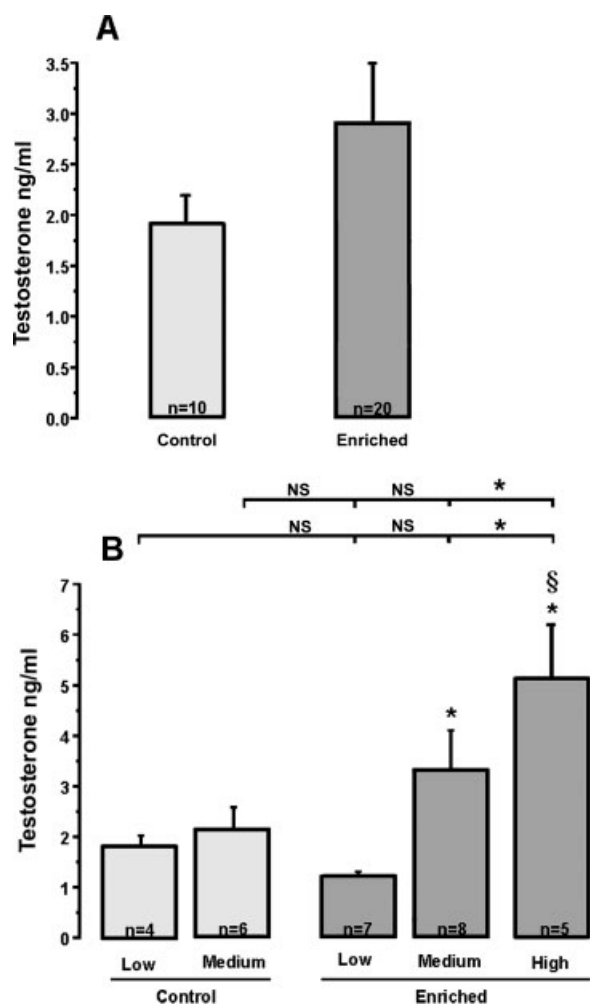


Figure 9 Testosterone plasma levels after EE exposure. Rats exposed for 10 days to EE showed a slight increase in testosterone production (A). Animals that showed higher activity during the EE session also had higher levels of testosterone compared with animals with medium or low activity (B). Bars represent mean \pm SEM of the number of animals included in each condition. Mann-Whitney U-test, * $p < 0.05$; NS = non-significant.

positive cells were observed in those individual with reduced anxiety-like responses after EE exposure. New neurons were also visualized with the neuronal marker DCX, which suggests a beneficial effect of an EE on neurogenesis in those rats with reduced anxiety levels. Thus, the present results strongly suggest a positive correlation between the degree of activity displayed in EE and neurogenesis, which receives support from previous findings showing a correlation between high displaying activity related with social behavior and an increased rate of neurogenesis in dentate gyrus of rats (Kozorovitskiy and Gould, 2004).

Moreover, Individual differences in the way in which animals interact with an EE have been recently reported to have an effect decreasing cerebral β AP peptides and amyloid deposits *in vivo* in male APP/PS1 transgenic mice, and also correlate with the increase in several genes that encode proteins involved in a variety of processes associated with learning and memory, vasculogenesis, neurogenesis, and cell survival pathways (Lazarov et al., 2005).

Although individual differences in groups of male mammals may result from the established social hierarchy, in our experimental paradigm of a five-male rat colony exposed together to the EE we did not detect the development of obvious dominance behaviors, which confirms previous reports that female presence is required in a rat colony for the development of a dominance hierarchy among males (Flannelly et al., 1977; Tamashiro et al., 2004).

In agreement with previous reports (Schrijver et al., 2002) we found similar CORT and ACTH baseline in animals housed in enriched or non-enriched conditions. However, a different study had shown elevated CORT basal secretion in EE-exposed rats (Moncek et al., 2004). The differences between this study and our results are likely caused by the fact that that rats in an EE are transiently exposed to more stimulation, which presumably causes intermittent hormonal activation at physiological levels that is probably difficult to detect at any time of the EE session.

A positive relationship between circulating testosterone, reduced anxiety, and cell proliferation was found. EE exposure appears to have a positive effect on testosterone production because the animals that showed higher activity during the EE session also had higher levels of testosterone and higher number of new hippocampal cells. In agreement with our results, previous studies report a positive correlation between testosterone levels and adult neurogenesis in several forebrain areas of voles and birds (Louissaint et al., 2002; Fowler et al., 2002; Absil et al., 2003).

In conclusion, our results demonstrate behavioral differences in differentially housed animals and indi-

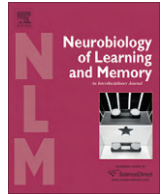
vidual differences in the consequences of enrichment on emotional reactions, linked with hippocampal cell proliferation and testosterone levels. Because EE may be considered a multifaceted condition, which may elicit a number of behavioral, neurochemical, and neuroanatomical changes among adult rats, individual differences should be taken into account when exploring its beneficial impact and when interpreting results on behavioral and brain plasticity studies.

The authors thank A. Zepeda for helping suggestions and I. Pérez-Montfort and M. Wasung for revising the English manuscript. P. Leal-Galicia was supported by CONA-CyT, México and DGAPA, UNAM.

REFERENCES

- Absil P, Pinxten R, Balthazart J, Eens M. 2003. Effect of age and testosterone on autumnal neurogenesis in male European starlings (*Sturnus vulgaris*). *Behav Brain Res* 143:15–30.
- Altman J, Das GD. 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124:319–335.
- Benaroya-Milshtein N, Hollander N, Apter A, Kukulansky T, Raz N, Wilf A, Yaniv I. 2004. Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. *Eur J Neurosci* 20:1341–1347.
- Bruel-Jungerman E, Laroche S, Rampon C. 2005. New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. *Eur J Neurosci* 21:513–521.
- Couillard-Despres S, Winner B, Schaubek S, Aigner R, Vroemen M, Weidner N, Bogdahn U, et al. 2005. Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur J Neurosci* 21:1–14.
- File SE, Kenny PJ, Cheeta S. 2000. The role of the dorsal hippocampal serotonergic and cholinergic systems in the modulation of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 66:65–72.
- File SE, Mabbutt PS, Hitchcott PK. 1990. Characterization of the phenomenon of “one-trial tolerance” to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology* 102:98–101.
- Fernandez-Teruel A, Gimenez-Llort L, Escorihuela RM, Gil L, Aguilar R, Steimer T, Tobena A. 2002. Early-life handling stimulation and environmental enrichment: Are some of their effects mediated by similar neural mechanisms? *Pharmacol Biochem Behav* 73:233–245.
- Flannelly K, Lore R. 1977. The influence of females upon aggression in domesticated male rats (*Rattus norvegicus*). *Anim Behav* 25:654–659.
- Fowler Ch, Liu Y, Ouimet Ch, Wang Z. 2002. The effects of social environment on adult neurogenesis in the female prairie vole. *J Neurobiol* 51:115–128.

- Gage FH. 2002. Neurogenesis in the adult brain. *J Neurosci* 22:612–613.
- Gould E, Gross CG. 2002. Neurogenesis in adult mammals: Some progress and problems. *J Neurosci* 22:619–623.
- Green S, Hodges H. 1991. Models of anxiety. In: Willner P, editor. *Behavioral Models in Psychopharmacology: Theoretical, Industrial, and Clinical Perspectives*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Jin K, Peel A, Mao X, Xie L, Cottrell B, Henshall D, Greenberg D. 2004. Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:343–347.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. 1997. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386:493–495.
- Kozorovitskiy Y, Gould E. 2004. Dominance hierarchy influences adult neurogenesis in the dentate gyrus. *J Neurosci* 24:6755–6759.
- Larsson F, Winblad B, Mohammed AH. 2002. Psychological stress and environmental adaptation in enriched vs. impoverished housed rats. *Pharmacol Biochem Behav* 73:193–207.
- Lazarov O, Robinson J, Tang YP, Aristón IS, Korade-Mirnic Z, Lee VM, Hersh LB, Sapolsky RM, Mirnic K, y Sisodia SS 2005. Environmental enrichment reduces A β levels and amyloid deposition in transgenic mice. *Cell* 120:701–713.
- Lister GG. 1990. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacol Ther* 46:321–340.
- Louissaint A Jr, Rao S, Leventhal C, Goldman SA. 2002. Coordinated interaction of neurogenesis and angiogenesis in the adult songbird brain. *Neuron* 34:945–960.
- Mohammed AK, Winblad B, Ebendal T, Larkfors L. 1990. Environmental influence on behavior and nerve growth factor in the brain. *Brain Res* 528:62–72.
- Moncek F, Duncko R, Johansson BB, Jezova D. 2004. Effect of environmental enrichment on stress related systems in rats. *J Neuroendocrinol* 16:423–431.
- Nilsson M, Perfilieva E, Johansson U, Orwar O, Eriksson PS. 1999. Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *J Neurobiol* 39:569–578.
- Rao MS, Shetty AK. 2004. Efficacy of doublecortin as a marker to analyze the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 19:234–246.
- Renner MJ, Rosenzweig MR. 1986. Social interactions among rats housed in grouped and enriched conditions. *Dev Psychobiol* 19:303–313.
- Rosenzweig MR. 1966. Environmental complexity, cerebral change, and behavior. *Am Psychol* 21:321–332.
- Tamashiro KL, Nguyen MM, Fujikawa T, Xu T, Yun Ma L, Woods SC, Sakai RR. 2004. Metabolic and endocrine consequences of social stress in a visible burrow system. *Physiol Behav* 80:683–693.
- Treit D. 1985. Animal models for the study of anti-anxiety agents: A review. *Neurosci Biobehav Rev* 9:203–222.
- Schrijver NC, Bahr NI, Weiss IC, Wurbel H. 2002. Dissociable effects of isolation rearing and environmental enrichment on exploration, spatial learning and HPA activity in adult rats. *Pharmacol Biochem Behav* 73:209–224.
- van Praag H, Kempermann G, Gage F. 1999. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 2:226–270.
- van Praag H, Schinder AF, Christine BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH. 2002. Neural consequences of environmental enrichment. *Nature* 415:1030–1034.



Long-term exposure to environmental enrichment since youth prevents recognition memory decline and increases synaptic plasticity markers in aging

Perla Leal-Galicia, María Castañeda-Bueno, Ricardo Quiroz-Baez, Clorinda Arias *

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000 Colonia Copilco, AP 70-228, 04510 México DF, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 January 2008

Revised 1 July 2008

Accepted 2 July 2008

Available online 19 August 2008

Keywords:

Aged rats

Environmental enrichment

Object-recognition memory

Neurogenesis

Synaptosomes

Synaptophysin

ABSTRACT

Aging-associated brain changes include functional alterations that are usually related with memory decline. Epidemiological reports show that a physically and intellectually active life provides a protective effect on this decline and delays the onset of several neurodegenerative diseases. The cellular mechanisms behind the behavioral-based therapies, such as environmental enrichment (EE) exposure, as a method for alleviating age-related memory impairments, are still unknown. Although some reports have shown the benefits of EE exposure in cognitive outcomes in old mice and in animals with experimental neurodegenerative conditions, the effects of lifelong animal exposure to EE have not been explored in detail. In the present work we tested in a rat model the effects of intermittent lifelong exposure since youth to EE on behavioral performance, object recognition memory and anxiety level, as well as on some morphological and biochemical markers of brain plasticity such as hippocampal neurogenesis, synaptophysin content and synaptic morphology. We found that environmental factors have a positive impact on short-memory preservation, as well as on the maintenance of synapses and in the increase in number of new generated neurons within the hippocampus during aging.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The aging process has long been associated with a decline in some physiological and cognitive outcomes. Thus, considering that the human population has more life expectancy, the issue of “successful aging” is of growing importance around the world. However, the relationship between age-associated brain changes and memory deficits are not well understood. Epidemiological reports show that a physically and intellectually active life provides a protective effect to sustain cognitive abilities (Colcombe et al., 2004a; Colcombe, Kramer, McAuley, Erickson, & Scaf, 2004b; Friedland et al., 2001; Snowdon et al., 1996; Wilson et al., 2002) and delays the onset of several neurodegenerative conditions like Alzheimer’s and Parkinson’s diseases (Jankowsky et al., 2005; Sasco, Paffenbarger, Gendre, & Wing, 1992). The cellular mechanisms behind the behavioral-based therapies, like exposure to environmental enrichment (EE) as a method for alleviating age-related memory impairments, are still unknown although it is thought that they work promoting the so-called cognitive reserve. Some reports show the benefits of exposure to EE in old mice and animals with neurodegenerative experimental conditions at molecular, cellular and behavioral levels. Reduction in amyloid load and activation of genes encoding proteins which involve processes associated with learning and memory, vasculogenesis and cell survival path-

ways in transgenic mice co-expressing familial AD-linked APP and PS1 variants have been recently described (Lazarov et al., 2005). In another paradigm of EE exposure, neurogenesis and growth factors were enhanced in old transgenic APP23 mice (Wolf et al., 2006). Benefits in the execution of learning and memory tasks in both old mice and in AD models have also been reported after EE (Bennett, McRae, Levy, & Frick, 2006; Colcombe et al., 2004a). Finally, the impact of EE exposure, enhancing both neurogenesis in the dentate gyrus and glutamate and GABA levels in the CA3 area of the hippocampus of old rats has been demonstrated (Segovia, Yagüe, García-Verdugo, & Mora, 2006).

In some of these works, EE exposure of mature animals was initiated at different times; however, the benefits of intermittent long-life exposure to EE since youth have not been assessed. In this work, we tested the effect of 3 h EE sessions per week for 18 months on the behavioral performance associated with emotionality (anxiety levels) and object recognition memory test as well as on some morphological and biochemical markers of brain plasticity such as neurogenesis, synaptic morphology and density connected with this environmental-associated benefic factor.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

All animals were handled with the necessary precautions to minimize the number of used animals and their suffering, in agree-

* Corresponding author. Fax: +52 55 56229182.

E-mail address: carias@servidor.unam.mx (C. Arias).

ment with Institutional and International guidelines. At 3 months of age (220–230 g), 20 male *Wistar* rats were kept in standard laboratory cages in stable communities of 5 rats in the same room as described previously (Leal-Galicia, Saldívar-González, Morimoto, & Arias, 2007) with inverted light/dark cycle (8:00 am lights off) and provided with food and water *ad libitum*.

2.2. Environmental enrichment

After 7 days habituation to the period of inverted light/dark cycle the rats were exposed to EE. The EE consisted of a large cage (0.70 × 0.50 × 0.22 m) containing different elements such as plastic tunnels, little plastic balls, small bells and a running wheel (Will, Rosenzweig, Bennett, Hebert, & Morimoto, 1977). We placed the groups of 5 rats in the EE system at the hours of highest activity of rats. Initially, rats were exposed for 2 h daily for 15 consecutive days. After this first exposure to EE, rats showed diminished performance in the enriched system. In order to avoid behavioral habituation, rats were then intermittently exposed to EE for 3 h once per week during 18 months. In each EE session, objects were changed around to offer a novel environment. In this complex environment, animals had the opportunity to display social interaction, exploratory behavior and voluntary physical exercise. Ten control 3-months-old rats were kept in conventional laboratory housing cages with no added stimuli during 18 months.

2.3. Novel object recognition test

Novel object recognition memory is a paradigm to examine the ability to discriminate the familiarity of previously encountered objects (Ennaceur & Delacour, 1998). The test was applied after 18 months of EE in a different room from the EE sessions with controlled temperature beginning 30 min before the habitual time for the EE session. Rats were carefully transported to the observation room and placed individually in an opaque plastic box with the same dimensions as used for the EE session. Initially, each rat was exposed for 5 min to the cage without objects for habituation to the new environment and after 24 h of this habituation session we carried out the memory test. The test consisted of two trials separated by an inter-trial interval of 24 h. The objects to be discriminated were two different and equally attractive equidistant objects. There were several copies of each object, which were used interchangeably. The objects were stick on the floor to avoid movement. Acquisition phase consisted of one 5 min exposure to the objects. The two objects were placed in the cage and the period spent in exploring the objects was recorded. Twenty-four hours later the second trial (retention phase), one object was replaced by a different one and the period spent exploring each object in a 5 min period was recorded. The role (familiar or novel) as well as the relative position of the two stimulus objects were counterbalanced and randomly exchanged for each experimental animal. In order to eliminate olfactory stimuli, the known object which is presented in the second trial was deeply cleaned after testing each animal. The exploratory index for analyzing the preference for the novel object (object recognition) was calculated according to Clark, Kuczenski, and Segal (2007), dividing the total time exploring the novel object (NO) by the total time exploring the NO plus the total time exploring the familiar object (FO) multiplied by 100: $NO / (NO + FO) \times 100$. An exploratory index >50% indicates the preference for exploring the novel objects.

2.4. Open-field test

The open-field task was performed to determine if there were any differences in the animal's exploratory response to a novel environment and also as a measure of anxiety. In order to deter-

mine anxiety and locomotion of old rats after chronic enrichment, non-enriched and EE old rats were subjected to the open-field test consisting in placing rats in a novel and relatively large arena. The open-field consists of a 1 × 1 m dark surface divided in 20 × 20 cm squares that allow quantifiable locomotion registration (Green & Hodges 1991). Exploration (locomotion) is recorded: high levels of locomotion at the center of the arena (crossings squares) indicate lack of anxiety, whereas anxious animals tend to move at the periphery of the arena (squares advanced). After 18 months groups of control and EE-rats were moved to a different bright space and each animal was independently placed in the center of the open-field for 5 min; the number of total locomotion: squares advanced and crossings inside the arena were hand-recorded.

2.5. 5-Bromo-2-deoxyuridine (BrdU) injection and tissue preparation

To examine the number of new cells in the dentate gyrus, animals were injected with the thymidine analog bromodeoxyuridine (BrdU) (Sigma–Aldrich, St. Louis MO.), dissolved in PBS. Experimental and control rats received three daily i.p. injections (100 mg/kg of body weight) during the last 3 days spent in either the enriched or the non-enriched environment. Twenty-four hours after the last injection rats were used for immunohistochemistry.

2.6. Brdu and doublecortin immunohistochemistry

Once the behavioral records had been registered, the EE and control 22-month-old rats were deeply anesthetized and transcardially perfused with 0.9% saline followed by fixative (4% formaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4). Brains were removed and left in fixative for 24 h. They were then successively transferred to 20% and 30% sucrose (24 h each). Coronal sections (30 μm) were cut in a cryostat and processed for immunohistochemistry. Free-floating sections were incubated at 4 °C overnight in blocking solution containing phosphate-buffered saline (PBS), 3% horse serum and 0.25% Triton X-100 (PBS-TS). After removing the blocking solution, sections were incubated for 48 h at 4 °C in anti-BrdU monoclonal antibody diluted 1:10 in the incubation buffer (kit Roche, Mannheim, Germany). At the end of this period, sections were rinsed 3 × 10 min in PBS and incubated for 90 min at room temperature with an anti-mouse IgG (1:100) secondary antibody (Vector, Laboratories, Burlingame, CA). After rinsing the sections in PBS, ABC reagent was applied for 1 h, followed by peroxidase detection for approximately 5 min using diaminobenzidine as chromogen (0.25 mg/ml diaminobenzidine, 0.01% H₂O₂, 0.04% NiCl). Negative controls consisted of eliminating primary antibodies in the procedure.

To analyze newly generated neurons we performed doublecortin (DCX) immunohistochemistry, which is a reliable way to visualize and analyze modulation of neurogenesis as has been explored in detail (Couillard-Despres et al., 2005; Rao & Shetty, 2004). Briefly, hippocampal sections were DCX polyclonal antibody (1:200) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). After this period the sections were rinsed in 0.1 M PBS three times for 10 min and incubated in an anti-goat secondary antibody (1:500) (Vector, Laboratories, Burlingame, CA) 1 h. The BrdU or DCX immunolabeling was done on adjacent hippocampal sections. The peroxidase reaction was visualized using diaminobenzidine as the chromogen. Positive cells from both DG were counted using a 40× objective (Zeiss, Axioskop 40) along the rostrocaudal location of the hippocampus. The number of BrdU- and DCX-positive cells in the subgranular zone (SGZ) and in the granule cell layer (GCL) was counted every sixth sections, respectively, of 30 μm each (every 180 μm) in all animals. To obtain a stereological estimate, the density of immunopositive cells was calculated by dividing the num-

ber of labeled cells by the sectional volume. This cell density was then multiplied by the reference volume which was determined as the sum of the sampled areas in SGZ and GCL multiplied by the distance between sampled sections (180 μm).

2.7. Synaptophysin content

The hippocampal formation was dissected and resuspended in lysis buffer containing 50 mM Tris, 1% NP-40 and 0.5% DOC, and with a cocktail of protease inhibitors (Complete, Roche). Samples were then sonicated and centrifuged for 1 h at 14,000 rpm. Fifty microgram protein from each sample was loaded onto a 10% SDS-PAGE. Proteins were then transferred to a nitrocellulose membrane. Membranes were blocked in 5% non-fat dried milk in PBS for 2 h at room temperature then, incubated for 48 h at 4 °C in primary antibody (monoclonal anti-synaptophysin, 1:500, Santa Cruz Biotechnology). After washing in PBS with 0.1% Tween, they were incubated with an anti-mouse IgG conjugated to horseradish peroxidase (1:10,000, Santa Cruz Biotechnology). Immuno-reactive bands were detected by chemiluminescence (ECL system, Amersham, IL, USA). Band intensity was quantified by densitometry. Bands were scanned using Fluor FS and analyzed with the program Quantity one 4.4.1 (BioRad). Synaptophysin densitometry values were normalized with respect to those obtained with an anti- α -tubulin monoclonal antibody (1:500, Sigma-Aldrich, USA).

2.8. Synaptosomes

Synaptosomes from non-enriched young (3 months) and aged (22 months) rats were obtained and compared with synaptosomes from the EE 22-months-old rats. Animals were killed by decapitation and a purified synaptosomal fraction was obtained by a slight modification of the procedure described by Löscher, Vetter, Böhme, and Stoltenburg-Didinger (1985). In brief, the hippocampus from both hemispheres was dissected on ice, homogenized in a solution containing 0.32 M sucrose and 5 mM HEPES, pH 7, and centrifuged at 3500 rpm for 10 min (4 °C). The supernatant was layered onto 1 ml of 1.2 M sucrose and centrifuged at 50,000 rpm (4 °C) 20 min. The gradient interphase was carefully collected and diluted with 0.32 M sucrose to a final volume of 2 ml. The diluted suspension was then layered onto 1 ml 0.8 M sucrose and centrifuged for 20 min at 50,000 rpm. This yielded a synaptosomal pellet which was resuspended in 2 ml of a Locke's solution, containing (in mM): 154 NaCl, 5.6 KCl, 2.3 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 3.6 NaHCO_3 , 5 glucose and 5 HEPES, pH 7.2. Aliquots of 200 μl containing 200 μg synaptosomal protein were incubated during 2, 3 or 4 h at 37 °C. For morphological analysis, an electron microscopic procedure was performed with 200 μg of synaptosomal protein pelleted and fixed for 30 min in 3% glutaraldehyde, pH 7.4. After rinsing in phosphate buffer, the pellet was postfixed in 1% osmium tetroxide. Sections were embedded in resin (Epon) and cut with a diamond knife stained with uranyl acetate. For each group of age, 2–3 separate animals from each condition were analyzed and from each individual, 5 micrographs (8000 \times and 25,000 \times) showing 5–6 synaptosomal sections from each experimental condition, were randomly chosen. The number of small clear vesicle (SCV) and the content of endosome-like organelles (ELO) as well as the total surface membrane area per nerve terminal was analyzed.

2.9. Statistical analysis

Data are presented as mean \pm SEM. Comparisons were made by Unpaired Student's *t*-test for calculating probability values. A *p* value <0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Effect of long-life exposure to environmental enrichment on behavioral performance

There was a remarkable effect of intermittent long-life exposure to EE on the object recognition test performance in aged rats when compared with aged-matched non-enriched rats. For both groups the total time exploring both objects was similar and the exploratory preference index during the acquisition trial was less than 50%, indicating that all groups interacted with the two objects for a similar amount of time (Fig. 1A and C). Twenty-four hours after the first trial, we conducted the retrieval phase of the memory test. EE-rats spent significantly more time exploring the new object and showed as exploratory preference index up to 50% (Fig. 1B and D). These data indicate that enriched environment along life has a beneficial effect in maintaining the capacity for recognition memory performance task.

In view that aged non-enriched rats significantly spent less time in exploring the new object in the retrieval phase compared with EE aged rats, we conducted experiments to analyze motor performance and anxiety through the open-field test which examine these reactions in a novel environment. While there were no differences in the motor activity between both groups of rats (Fig. 2A), the number of squares advanced in the periphery of the arena was smaller in EE-exposed aged rats compared to non-exposed (14.7 ± 3.29 and 22.5 ± 2.53 , respectively) (Fig. 2B). Contrary, the number of crossings through the center of the open-field by lifelong EE-rats was significantly increased as compared with non-enriched aged rats (17.7 ± 3.39 and 3.66 ± 0.98 min) (Fig. 2C). These results suggest that the animals submitted to enrichment displayed less anxiety-like behaviors.

3.2. Effects of environmental enrichment on neurogenesis

No evident morphological changes were observed in the hippocampus when controls were compared to EE old rats. BrdU- and DCX-positive neurons were typically found in the SGZ and GCL. The number of BrdU-positive cells among animals exposed to the EE was larger than in non-enriched aged animals (918 ± 120 and 460 ± 95 , respectively, Fig. 3A). Moreover, rats housed in EE conditions showed a greater number of DCX-positive neurons (619 ± 11) compared with control old rats (238 ± 36) (Fig. 3B, C and E see higher magnifications in D and F). The estimate percentage of DCX/BrdU-cells calculated from consecutive slices stained with each marker was 51% in control rats and 67% in EE-rats.

3.3. Effects of environmental enrichment on synaptic markers

In attempting to understand some of the neurobiological mechanisms that underlie the positive action of EE along life, we studied markers linked with brain plasticity. As an important form of brain plasticity is synaptic remodeling, we analyzed the levels of the synaptic protein, synaptophysin. In Fig. 4 we compare the effect of housing conditions between young rats exposed during 15 days to EE and old rats with lifelong exposure to EE. In both young and lifelong exposed rats a small ($\approx 10\%$) but significant effect was observed on synaptophysin levels. Morphological aspects of isolated nerve endings were also analyzed. In view that synaptic vesicle density does appear to be influenced by aged and to correlate with synaptophysin levels; the synaptic vesicle content was also estimated in the same tissue. In most synaptosomal section from young rats (3-months-old) housed in standard conditions, the pool of small clear vesicles (SCV) was clearly observed but in synaptosomes obtained from aged rats the presence of endosome-like organelles was noteworthy. Small clear vesicle (SCV)

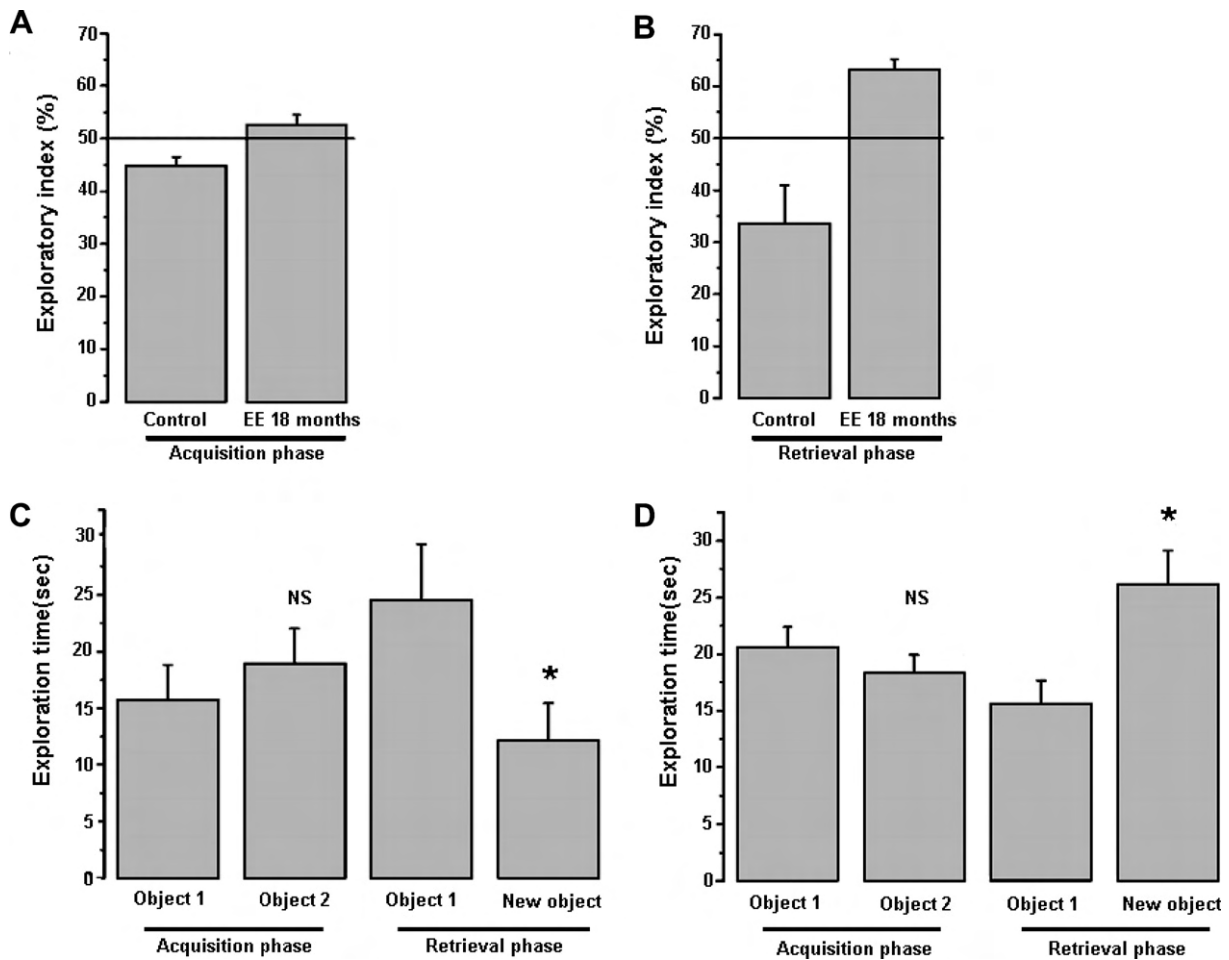


Fig. 1. Object-recognition memory task after long-life exposure to EE in aged rats. The total time exploring objects and the exploring preference index are presented. There were no differences in the time spent in exploring object 1 compared with object 2 neither in the exploratory index during the acquisition trial between non-EE and EE-exposed rats (A, C). However, EE aged rats showed exploratory preference index up to 50% during the retrieval task (B) and expended significantly more time exploring the new object (D). This result suggests that EE-exposed aged rats remembered the familiar object and preferably explored the novel object. Results are expressed as mean \pm SEM from 5 to 8 animals per group (non-enriched and enriched rats, respectively). Unpaired Student's *t*-test, $p < 0.05$. NS, non-significant.

content in seven different sections was different in young rats (47.4 ± 3), aged rats (28.6 ± 2.7) and EE aged rats (39.6 ± 2.7). In synaptosomes obtained from the hippocampus of aged rats (EE or non-EE) the content of endosome-like organelles (ELO) expressed as the percentage of total SCV content was remarkably higher (10% and 7%, respectively) than in synaptosomes from young animals (1.2%). However total surface area per terminal did not change significantly when compared control young rats ($2.16 \pm 0.147 \mu\text{m}$) with aged non-EE ($2.31 \pm 0.087 \mu\text{m}$) or aged EE-rats ($2.27 \pm 0.119 \mu\text{m}$) (Fig. 5).

4. Discussion

In this work we show that lifelong exposure to EE is able to prevent age-related recognition memory deficits and reduces rat anxiety in a novel environment, with the concomitant increase in neurogenesis and synaptic markers in the hippocampus. Thus, our results suggest that the favorable effect of lifelong enrichment on rat short-memory and emotionality correlates with an elevated rate of newly generated neurons and increased synaptic plasticity which may contribute to enhance the hippocampal neural network function.

The hippocampus plays an important role in specific types of learning and memory that are impaired in a large percentage of elderly people. Dendritic sprouting and synaptogenesis play impor-

tant roles in the EE-induced recovery of learning and memory after ischemic damage (Briones, Suh, Jozsa, & Woods, 2006) and probably in increased neurogenesis in the dentate gyrus as well (van Praag, Kempermann, & Gage, 2000). The mechanisms underlying the enrichment-induced biochemical and morphological brain changes appear to be complex but may involve the expression of genes associated with angiogenesis, neurogenesis, synaptic plasticity and cell survival pathways as has been recently found (Lazarov et al., 2005; Rampon et al., 2000a, 2000b). EE apparently acts through multisensorial activation including visual, tactile and olfactive stimulation as well as promoting social interaction and physical activity, and a body of evidence suggests a role of physical activity in protecting the brain from aging-associated decline (for a review see Kramer, Erickson, & Colcombe, 2006; Nithianantharajah & Hannan, 2006). Physical exercise improves hippocampus-related spatial learning tasks (Fordyce & Wehner, 1993), increases the expression of the NMDA receptor subunit, NR2B (Farmer et al., 2004), enhances the mRNA of the BDNF (Neeper, Gomez-Pinilla, Choi, & Cotman, 1995) and increases neurogenesis (van Praag, Shubert, Zaho, & Gage, 2005). We described here a protocol for EE exposure that consists in early EE sessions of 2 h during 15 consecutive days beginning at 3 months of rat age, followed by intermittent exposure (one session of 3 h per week) during 18 months. We choose this protocol based on our previous observations regarding to a decline in the level of rat interaction with different

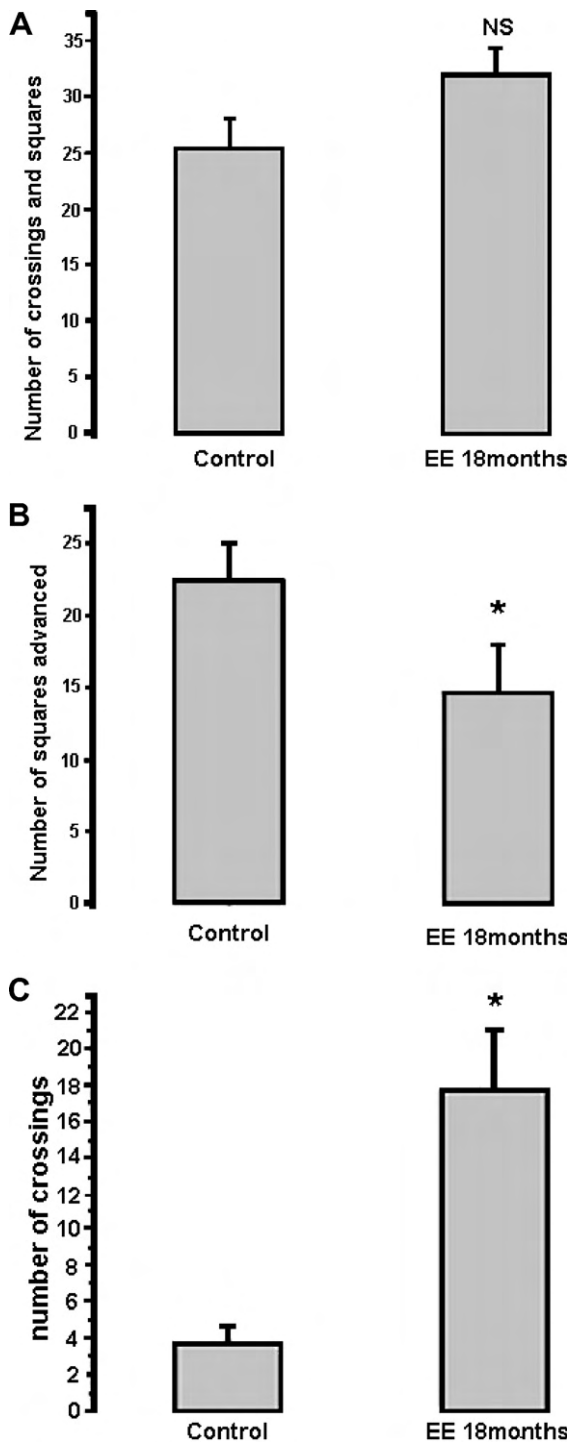


Fig. 2. Anxiety levels after lifelong exposure to EE in the open-field test in aged rats. Animals were located in the center of the open-field for 5 min and total number of squares advanced and the number of crossings through squares were recorded (A). While control rats spent more time exploring in the periphery of the arena (squares advanced) than EE-rats (B), the latter spent more time exploring the center of the open-field (crossings) (C), suggesting that EE-rats have less anxiety levels because of their ability to contend with an open space. Results are expressed as mean \pm SEM of 5 animals per group (non-enriched and enriched rats). Unpaired Student's *t*-test, $p < 0.05$ when EE-rats were compared with non-EE-rats.

aspects of EE that occurred when rats were daily submitted to enrichment. Thus, in order to maintain the novelty component of the enrichment animals were intermittently exposed lifelong to EE.

Previously, we established a correlation between increased neurogenesis and changes in rat emotionality (Leal-Galicia et al.,

2007). Here, we demonstrated a positive link between enhanced neurogenesis, improvement in recognition memory and reduced anxiety-like response in old rats after lifelong exposure to EE.

Our data indicate that there is a decrease in cell proliferation in the aged rats since BrdU-labelled cells were reduced compared with the levels previously reported in young animals (Leal-Galicia et al., 2007). We also found a slightly increase in the proportion of DCX-positive new neurons with respect to BrdU-positive cells in EE-exposed rats suggesting that lifelong exposure to EE have an impact on the rate of hippocampal cell proliferation and in its differentiation to neurons. However, it is noteworthy that in the present study elderly EE-rats exhibited a higher number of DCX-positive new neurons. Reduction in DCX-positive neurons has been observed in aged rats and there is evidence indicating that a decrease in neurogenesis (DCX) seems to be related to performance deficits on hippocampus-dependent tasks (Driscoll et al., 2006).

Concomitant with enhanced neurogenesis we found increased levels of synaptophysin in the hippocampus of old rats (22 months) exposed during 18 months to intermittent (once a week) EE, of similar magnitude to that reached by young rats (3 months) continuously exposed during 15 days to EE. Moreover, we found that the content of synaptophysin, which has been widely used as a correlate of synaptogenesis, coincides with an increase in synaptic vesicle content in synaptosomes from old rats housed in an EE as compared with rats housed in conventional laboratory conditions. Although some controversy exists about the effects of EE exposure on synaptophysin levels in aging (Bennett et al., 2006), other reports present evidence of the EE-dependent increase in the number of synapses (Rampon et al., 2000a, 2000b; Saito et al., 1994) dendritic spines (Leenders, Scholren, De Lange, Lopes Da Silva, & Ghijsen, 2002; Moser and Trommald Andersen, 1994) and synaptic vesicle contents (Nakamura, Kobayashi, Ohashi, & Ando, 1999). The discrepancies could be due to the paradigm used for enrichment, e.g. animal age, time of exposure, gender and the brain structure analyzed.

To date little is known about the morphological characteristics of the presynaptic structures isolated from old rats. This study provides the first analysis showing differential synaptic vesicle content and vesicle type. Synaptosomes from aged rats had a considerable number of ELO concomitant with reduced number of total SCV. These ultrastructural characteristics may reflect an altered mechanism of vesicle recycling during aging. Supporting this conclusion previous evidence shows that vesicle recycling occurs through formation of an endosomal intermediate without enlargement of the membrane surface area in synaptosomes obtained from young mice brain (Leenders et al., 2002). These modifications may, to some degree, be compensated by exposure to EE.

It has been shown that a loss of synaptic connections in the hippocampus can be correlated with spatial learning deficits in aged animals (Geinisman, de Toledo-Morrell, & Morrell, 1986); thus, facing complex experiences along life appears to facilitate structural changes in synapsis, which supports the hypothesis that behavioral activity triggers synaptic plasticity.

Object-recognition memory is the ability to discriminate between objects that have been previously encountered and objects that have not. This ability tends to be impaired in patients with damage to temporal-lobe structures, which typically includes the hippocampus (Mumby, Tremblay, Lecluse, & Lehmann, 2005). In elderly people, short-term memory, which depends on the hippocampus, is diminished (Persson & Nyberg, 2006) and some epidemiological studies have established the advantage of mental stimulation and social interaction to preserve the cognitive function (Brunner, 2005). In the present work we found a decline in the performance of the recognition memory task in 22-month-old rats. Long-life exposure of young rats to intermit-

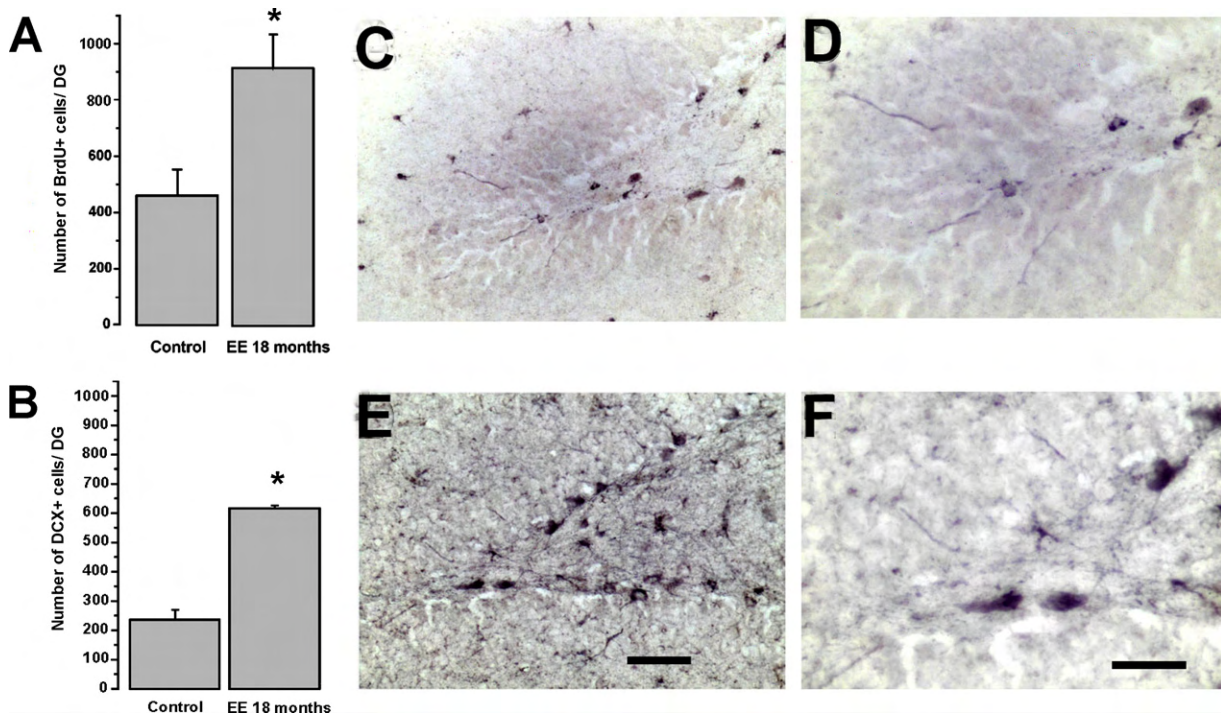


Fig. 3. Light micrographs and quantification of BrdU- and DCX-immunolabeled cells in aged rats exposed during 18 months to intermittent EE. Total number of BrdU-cells and DCX-positive neurons are depicted in A and B, respectively. Representative micrographs of the DCX-positive neurons in dentate gyrus from control aged rats (C, high magnification in D) and from EE-rats (E, high magnification in F). Results represent the mean \pm SEM of 5 animals for each group (non-EE- and EE-rats). Unpaired Student's *t*-test, $p < 0.05$. Scale bars = 50 (C, E) and 20 μ m (D, F).

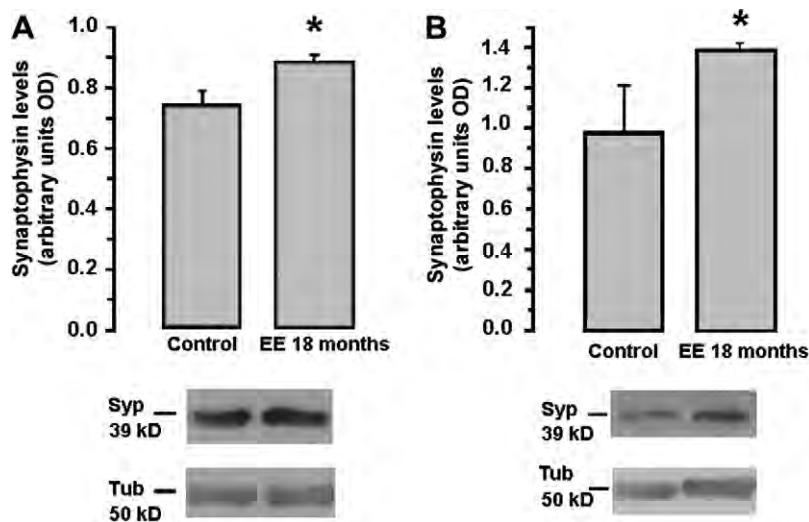


Fig. 4. Synaptophysin levels in the hippocampus after exposure to EE of young (A) and aged rats (B). The histograms show the densitometric analysis of synaptophysin levels normalized by the content of the protein α -tubulin in each case. A representative Western-blot from naive young rats (3 months) and after 15 days of EE is shown in A. B shows a representative Western-blot from control aged rats and from rats exposed to EE (22 months) once per week during 18 months. The results are mean \pm SEM of triplicate results of four young and two for each group of aged rats. Unpaired Student's *t*-test $p < 0.05$.

tent EE improved the performance of this kind of memory. Experiments assessing the role of the hippocampus in recognition memory have produced conflicting results, and whether or not the hippocampus is required for intact recognition memory remains a source of considerable debate (Mumby, 2001). However, it has been reported a delay-dependent effect in recognition memory impairments in rats (Clark, Zola, & Squire, 2000) and in humans with discrete hippocampal damage (Pascalis, Hunkin, Holdstock, Isaac, & Mayes, 2004) supporting the participation of this brain region in the memory task explored here. Interestingly, the EE-exposed and non-exposed aged rats spent similar time in

exploring the two objects in both, acquisition and retrieval phases suggesting that both groups of rats had similar motor and motivational performance. However the significant difference is observed in EE-exposed rats which spent more time exploring the new object in the retrieval phase compared with non-exposed rats. Hence, naive aged rats were not able to detect object novelty different to EE-exposed rats, which showed object recognition memory after inter-trial delays of up to 24 h. Although there were no differences in motor activity between both groups of rats as shown by our open-field results, non-enriched aged rats displayed anxiety-like behavior which may determine fear reactions

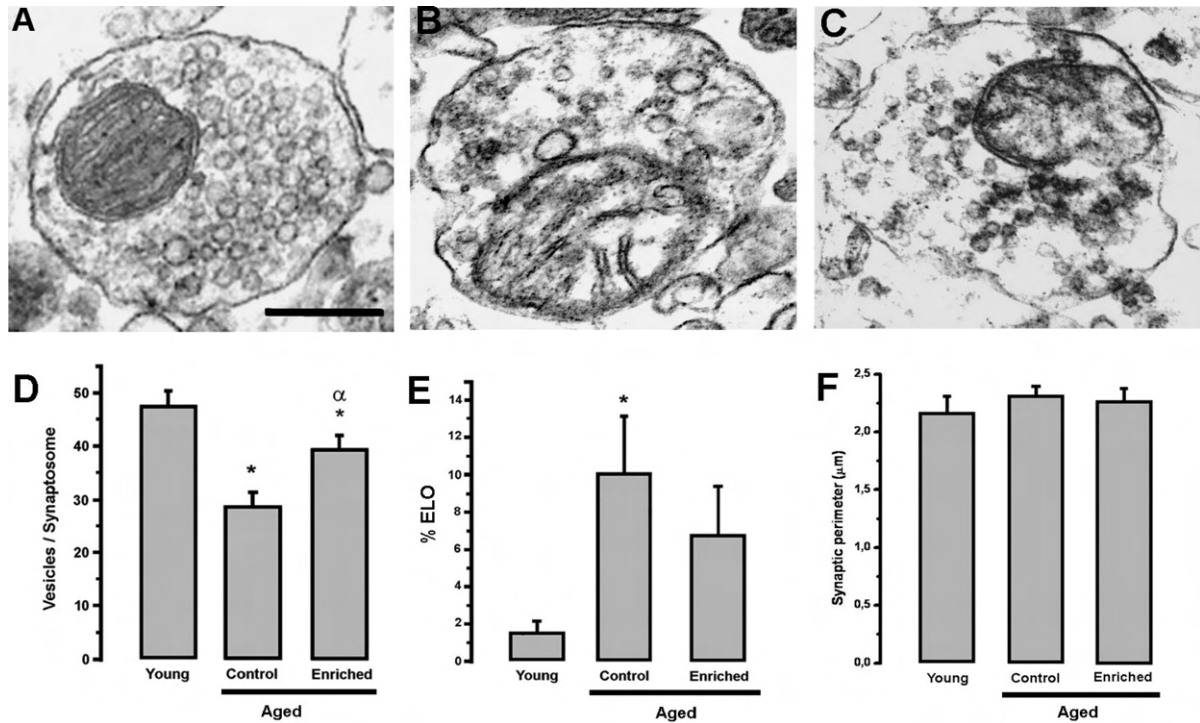


Fig. 5. Electron micrographs of representative hippocampal synaptosomes of young (A), aged (B) and aged rats exposed to EE (C). Graphs show the number of small clear vesicles (SCV) (D), the percentage of endosome-like organelles (ELO) (E) and total surface membrane area per synaptosome (F). A large reduction in SCV during aging is observed and partially reversed after EE exposure. It is also remarkable the increased number of ELO in synaptosomes of non-enriched aged rats. Results are means \pm SEM of synaptosomal markers in 5–6 fields from three control young rats and two from each EE-enriched and non-enriched aged rats. Unpaired Student's *t*-test, $p < 0.01$ relative to synaptosomes obtained from young rats; $^{\alpha}p < 0.05$ relative to control aged rats. Scale bar = 200 nm.

to novelty in the object recognition memory task. While we can not exclude this last possibility, the fact that the exploratory preference index clearly showed the preference of enriched aged rats for exploring the novel object, we can conclude that lifelong exposure to EE has a beneficial effect on object recognition memory preservation. In accordance with our finding it has been reported that EE improves spatial memory decline observed in middle-aged rats and mice (Bennett et al., 2006; Frick, Stearns, Pan, & Berger-Sweeney, 2003; Kempermann, Kuhn, & Gage, 1998; Nakamura et al., 1999).

In conclusion our findings may to some extent explain the cognitive advantage of long-life exposure to complex environmental conditions and sustain the hypothesis that environmental factors have an impact on preservation of some types of memory, in maintaining synapses and in increasing the number of newly generated neurons in the hippocampus during aging. Moreover, knowing the mechanisms underlying brain changes induced by long-life exposure to EE will be useful to understand the mechanisms underlying normal and pathological brain aging.

Acknowledgments

The authors thank A. Zepeda for helpful suggestions, I. Pérez-Montfort for revising the English manuscript, and P. Ferrera for excellent technical assistance. P. Leal-Galicia was supported by CONACyT, México and DGAPA 181550 and DGP, UNAM. This work was supported in part by PAPIIT Project No.: IN217806, UNAM.

References

Bennett, J., McRae, P., Levy, L., & Frick, K. (2006). Long-term continuous, but not daily, environmental enrichment reduces spatial memory decline in aged male mice. *Neurobiology of Learning and Memory*, 85, 139–152.

- Briones, T. L., Suh, E., Jozsa, L., & Woods, J. (2006). Behaviorally induced synaptogenesis and dendritic growth in the hippocampal region following transient global cerebral ischemia are accompanied by improvement in spatial learning. *Experimental Neurology*, 198, 530–538.
- Brunner, E. J. (2005). Social and biological determinants of cognitive aging. *Neurobiology of Aging*, 26, 17–20.
- Clark, R. E., Kuczynski, R., & Segal, D. S. (2007). Escalating dose, multiple binge methamphetamine regimen does not impair recognition memory in rats. *Synapse*, 61, 515–522.
- Clark, R. E., Zola, S. M., & Squire, L. R. (2000). Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 20, 8853–8860.
- Colcombe, S. J., Kramer, A. F., Erickson, K. I., Scalf, P., McAuley, E., & Cohen, N. J. (2004a). Cardiovascular fitness cortical plasticity and aging. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 3316–3321.
- Colcombe, S. J., Kramer, A. F., McAuley, E., Erickson, K. I., & Scalf, P. (2004b). Neurocognitive aging and cardiovascular fitness: Recent findings and future directions. *Journal of Molecular Neuroscience*, 24, 9–14.
- Couillard-Despres, S., Winner, B., Schauback, S., Aigner, R., Vroemen, M., Weidner, N., et al. (2005). Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *European Journal of Neuroscience*, 21, 1–14.
- Driscoll, I., Howard, S. R., Stone, J. C., Monfils, M. H., Tomanek, B., Brooks, W. M., et al. (2006). The aging hippocampus: A multi-level analysis in the rat. *Neuroscience*, 139, 1173–1185.
- Ennaceur, A., & Delacour, J. (1998). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats 1: Behavioral data. *Behavioural Brain Research*, 31, 47–59.
- Farmer, J., Zhao, X., van Praag, H., Wodtke, K., Gage, F. H., & Christie, B. R. (2004). Effects of voluntary exercise on synaptic plasticity and gene expression in the dentate gyrus of adult-male Sprague–Dawley rats in vivo. *Neuroscience*, 124, 71–79.
- Fordyce, D. E., & Wehner, J. M. (1993). Physical activity enhances spatial learning performance with an associated alteration in hippocampal protein kinase C activity in C57BL/6 and DBA/2mice. *Brain Research*, 13, 111–119.
- Frick, K. M., Stearns, N. A., Pan, J. Y., & Berger-Sweeney, J. (2003). Effects of environmental enrichment on spatial memory and neurochemistry in middle-aged mice. *Learning and Memory*, 10, 187–198.
- Friedland, R. P., Fritsch, T., Smyth, K. A., Koss, E., Lerner, A. J., & Chen, C. H. (2001). Patients with Alzheimer's disease have reduced activities in midlife compared with healthy control-group members. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 3440–3445.
- Geinisman, Y., de Toledo-Morrell, L., & Morrell, F. (1986). Loss of perforate synapses in the dentate gyrus: Morphological substrate of memory deficit in aged rats.

- Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 83, 3027–3031.
- Green, S., & Hodges, H. (1991). Models of anxiety. In P. Willner (Ed.), *Behavioral models in psychopharmacology: Theoretical industrial and clinical perspectives*. Cambridge: University Press.
- Jankowsky, J., Melnikova, T., Fadale, J., Xu, G., Slunt, G., Gonzales, V., et al. (2005). Environmental enrichment mitigates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience*, 25, 5217–5224.
- Kempermann, G., Kuhn, H. G., & Gage, F. H. (1998). Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *The Journal of Neuroscience*, 18, 3206–3212.
- Kramer, A. F., Erickson, K. I., & Colcombe, S. J. (2006). Exercise, cognition, and the aging brain. *Journal of Applied Physiology*, 10, 1237–1242.
- Lazarov, O., Robinson, J., Tang, Y. P., Aristón, I. S., Korade-Mirnic, Z., Lee, V. M., et al. (2005). Environmental enrichment reduces A β levels and amyloid deposition in transgenic mice. *Cell*, 120, 701–713.
- Leal-Galicia, P., Saldívar-González, A., Morimoto, S., & Arias, C. (2007). Exposure to environmental enrichment elicits differential hippocampal cell proliferation: Role of individual responsiveness to anxiety. *Developmental Neurobiology*, 67, 395–405.
- Leenders, A. G. M., Scholren, G., De Lange, R. P. J., Lopes Da Silva, F. H., & Ghijsen, W. E. J. M. (2002). Sequential changes in synaptic vesicle pools and endosome-like organelles during depolarization near the active zone of central nerve terminals. *Neuroscience*, 109, 195–206.
- Löshner, W., Vetter, M., Böheme, G., & Stoltenburg-Didinger, G. (1985). In vivo effects of anticonvulsant drugs on nerve terminal (synaptosomal) GABA levels in 11 brain regions of the rat. *Journal of Neural Transmission*, 63, 157–167.
- Moser, M., & Trommald Andersen, P. (1994). An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests the formation of new synapses. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 12673–12675.
- Mumby, D. G. (2001). Perspectives on object-recognition memory following hippocampal damage: Lessons from studies in rats. *Behavioral Brain Research*, 127, 159–181.
- Mumby, D. G., Tremblay, A., Lecluse, V., & Lehmann, H. (2005). Hippocampal damage and anterograde object-recognition in rats after long retention intervals. *Hippocampus*, 15, 1050–1056.
- Nakamura, H., Kobayashi, S., Ohashi, Y., & Ando, S. (1999). Age-changes of brain synapses and synaptic plasticity in response to an enriched environment. *Journal of Neuroscience Research*, 56, 307–315.
- Neeper, S., Gomez-Pinilla, F., Choi, J., & Cotman, J. C. (1995). Exercise and brain neurotrophins. *Nature*, 373, 109–195.
- Nithianantharajah, J., & Hannan, A. J. (2006). Enriched environments, experience dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nature Review Neuroscience*, 7, 697–709.
- Pascalis, O., Hunkin, N. M., Holdstock, J. S., Isaac, C. L., & Mayes, A. R. (2004). Visual paired comparison performance is impaired in a patient with selective hippocampal lesions and relatively intact item recognition. *Neuropsychologia*, 42, 1293–1300.
- Persson, J., & Nyberg, L. (2006). Altered brain activity in healthy seniors: What does it mean? *Progress on Brain Research*, 157, 45–56.
- Rampon, C., Jiang, C. H., Dong, H., Tang, Y. P., Lockhart, D. J., Schultz, P. G., et al. (2000b). Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 12880–12884.
- Rampon, C., Tang, Y. P., Goodhouse, J., Shimizu, E., Kyin, M., & Tsien, J. Z. (2000a). Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nature Neuroscience*, 3, 238–244.
- Rao, M. S., & Shetty, A. K. (2004). Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus. *European Journal of Neuroscience*, 19, 234–246.
- Saito, S., Kobayashi, S., Ohashi, Y., Igarashi, M., Komiya, Y., & Ando, S. (1994). Decreased synaptic density in aged brains and its prevention by rearing under enriched environment as revealed by synaptophysin contents. *Journal of Neuroscience Research*, 39, 57–62.
- Sasco, A. J., Paffenbarger, R. S., Jr., Gendre, I., & Wing, A. L. (1992). The role of physical exercise in the occurrence of Parkinson's disease. *Archives of Neurology*, 49, 360–365.
- Segovia, G., Yagüe, A. G., García-Verdugo, J. M., & Mora, F. (2006). Environmental enrichment promotes neurogenesis and changes the extracellular concentrations of glutamate and GABA in the hippocampus of aged rats. *Brain Research Bulletin*, 70, 8–14.
- Snowdon, D. A., Kemper, S. J., Mortimer, J. A., Greiner, L. H., Wekstein, D. R., & Markesbery, W. R. (1996). Linguistic ability in early life and cognitive function and Alzheimer's disease in late life findings from the nun study. *JAMA*, 275, 528–532.
- van Praag, H., Kempermann, G., & Gage, F. H. (2000). Neuronal consequences of environmental enrichment. *Nature Review Neuroscience*, 1, 191–198.
- van Praag, H., Shubert, T., Zaho, C., & Gage, F. H. (2005). Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *The Journal of Neuroscience*, 21, 8680–8685.
- Will, B. E., Rosenzweig, M. R., Bennett, E. L., Hebert, M., & Morimoto, H. (1977). Relatively brief environmental enrichment aids recovery of learning capacity and alters brain measures after postweaning brain lesions in rats. *Journal of Comparative Physiology Psychology*, 91, 33–50.
- Wilson, R. S., Mendes DeLeon, C. F., Barnes, L. L., Schneider, J. A., Bienias, J. L., Evans, D. A., et al. (2002). Participation in cognitively stimulating activities and risk of incident Alzheimer disease. *The Journal of the American Medical Association*, 287, 742–748.
- Wolf, S., Kronenberg, G., Lehmann, K., Blankenship, A., Overall, R., Staufenbiel, M., et al. (2006). Cognitive and physical activity differently modulate disease progression in the amyloid precursor protein (app)-23 model of Alzheimer's disease. *Biological Psychiatry*, 60, 1314–1323.

IX. DISCUSIÓN

Como mencionamos anteriormente, la estimulación física y cognitiva promovida por la exposición al modelo de AE induce cambios neuroquímicos, hormonales y morfológicos en el cerebro. Dichos cambios se ven reflejados en un mejor desempeño en tareas conductuales así como en la emocionalidad de los sujetos.

En el presente trabajo demostramos en primera instancia, que la regulación positiva inducida por la exposición a un AE está en función del nivel de actividad que el sujeto tiene con el modelo. Los sujetos que tiene un nivel de actividad alto muestran un mayor incremento en la proliferación celular del hipocampo cuantificada por el número de núcleos positivos a BrdU. Este grupo muestra también mayor complejidad en la morfología de las células positivas a DCX.

En las ratas con un nivel de interacción bajo no se observa ningún cambio, e incluso tienen un número de células BrdU positivas muy parecido al control, lo que confirma que el nivel de interacción con el AE está relacionado a los cambios induce.

Describimos también un grupo de actividad media que presentó un menor número de núcleos positivos a BrdU con respecto el grupo de actividad alta, pero superior al grupo de actividad baja lo que nos sugiere al menos tres niveles de respuesta al AE.

Por otra parte, observamos que las ratas expuestas a un AE presentan una reducción en los niveles de ansiedad, medidos en pruebas conductuales. En este caso igualmente vimos una relación entre el nivel de actividad y el grado de ansiedad de los animales: aquellos con mayor nivel de actividad tienen menores niveles de ansiedad y los animales con un nivel de actividad bajo muestran un nivel de ansiedad alto en las pruebas conductuales. Los animales que desplegaron un nivel de interacción bajo con el AE se comportan muy parecido a los animales no expuestos al AE. Asimismo, observamos una relación directa entre el nivel de actividad en el AE y los niveles de la hormona testosterona, la cual ha mostrado tener una relación positiva con la neurogénesis (Louissaint et al., 2002; Fowler et al., 2002; Absil et al., 2003).

Se ha planteado que el efecto benéfico del AE se debe a la complejidad y novedad que ofrecen “un reto” a los sujetos (Kempermann et al., 2003). En el presente trabajo también mostramos que el grado en que los sujetos se confrontan con este “reto” es una variable importante que regula el impacto del AE en el cerebro y la conducta del sujeto. Nuestros resultados se respaldan con datos previos que reportan una relación positiva entre el nivel de actividad en el AE y la disminución de niveles de péptido β -amiloide y depósitos

amiloides en el doble transgénico APP/PS1, y estas diferencias se reflejan también en el incremento en la expresión de genes (Lazarov et al., 2005).

Las diferencias observadas en el nivel de interacción pueden deberse a varios factores entre los cuales está la posición jerárquica que ocupan los animales en el grupo, sin embargo en el caso de nuestros grupos este factor se descarta por dos razones. Una que manejamos comunidades estables, es decir, los animales de cada grupo estuvieron juntos desde pequeños. La segunda es que se ha reportado que es necesaria la presencia de hembras para que en una comunidad estable de machos se observen conductas de dominancia jerárquica (Flannelly et al., 1977; Tamashiro et al., 2004).

De lo anterior podemos concluir que la exposición a un AE disminuye las conductas de ansiedad y, como ya ha sido demostrado antes, promueve un incremento en la neurogénesis del hipocampo (Kempermann et al., 1997; van Praag et al., 2000; Benaroya-Milshtein et al., 2004; Bruel-Jungerman et al., 2005). Sin embargo este efecto está mediado por el nivel de actividad que el animal tenga con el AE; esto pudiera deberse a que el AE ayude a expresar o reforzar conductas que de manera natural cada animal tiene y en el escenario del AE despliega.

En este sentido nuestros datos sugieren que la posibilidad que tienen los animales expuestos al AE de desplegar conductas motoras, tener acceso a estimulación sensorial multimodal (olfativa, visual, auditiva, táctil) así como establecer relaciones sociales modula diferentes aspectos de la fisiología cerebral y en el caso del hipocampo ayuda a mejorar aspectos estructurales (neurogénesis) y conductuales (ansiedad). Aunque hasta el momento es difícil establecer el vínculo entre la actividad desplegada en un AE y señales moleculares que de esta se originan, en el presente trabajo reportamos que algunas hormonas pueden modularse positivamente, como la testosterona.

Por otro lado, es bien sabido que el envejecimiento normal se acompaña de un decaimiento en funciones cognitivas y cambios morfológicos como disminución en la sinaptogénesis, dendritogénesis y neurogénesis. Sin embargo se ha demostrado que el llevar una vida activa tanto física como intelectual retarda la aparición de estos signos (Colcombe et al., 2004a; Colcombe et al., 2004b; Friedland et al., 2001; Snowdon et al., 1996; Wilson et al., 2002). En modelos experimentales se ha demostrado que el AE subsana varias de las alteraciones que acompañan al envejecimiento natural (Kempermann et al., 1998; Bennett et al., 2006) y en modelos de patologías propias del envejecimiento como la demencia tipo Alzheimer o el Parkinson (Sasco et al., 1992; Jankowsky et al., 2005; Lazarov et al., 2005; Wolf et al., 2006). En estos trabajos se ha

explorado el efecto de vivir en un AE (Kempermann et al., 1998; Frick et al., 2003; Nakamura et al., 1999) y en algunos más se ha aplicado el AE iniciando a edades avanzadas o por tiempos cortos (Bennett et al 2006).

En el presente trabajo probamos el efecto que tiene en el envejecimiento, la exposición desde una edad temprana (3 meses) y durante toda la vida a un AE. También variamos el protocolo exponiendo a las ratas solo una vez a la semana con el propósito de mantener la novedad, en contraposición a vivir dentro del AE. Lo anterior tratando de evitar que el sujeto se habitúe al AE e interaccione menos. Esto es importante ya que en observamos que el grado de interacción con el AE decae con los días, incluso cambiando los objetos constantemente de posición. Dado que reportamos en un trabajo anterior (Leal-Galicia et al., 2007) que el grado de interacción con el AE se relaciona con el impacto que tiene en el sujeto decidimos realizar estas modificaciones al protocolo que usamos inicialmente (2h diarias por 15 días).

En el presente trabajo encontramos que 18 meses de exposición intermitente a un AE reporta beneficios en el desempeño de ratas de 21 meses en la prueba de reconocimiento de objetos novedosos. En esta prueba el animal tiene que discriminar entre un objeto conocido al que fue expuesto anteriormente y uno completamente nuevo. Se ha demostrado que la ejecución de esta prueba se altera con daño leve del hipocampo (Clark et al., 2000). Nosotros mostramos que las ratas de 21 meses que estuvieron en condiciones habituales de alojamiento en el laboratorio tuvieron un desempeño deficiente en dicha tarea dado que su índice de exploración durante la fase de recuperación es apenas mayor al 50%, lo que sugiere que no discriminaron entre el objeto nuevo y el conocido. Esta deficiencia se previene con la exposición prolongada a un AE ya que las ratas que estuvieron 18 meses expuestas a él exploraron mayor tiempo el objeto novedoso en la fase de recuperación. Lo anterior sugiere que el animal puede discriminar entre el objeto conocido y el nuevo. Podemos atribuir este resultado a que el animal recordó el objeto y no al efecto de la neofobia (una característica de sujetos estresados) ni a diferencias en la locomoción, ya que no se observaron diferencias significativas entre los dos grupos en la conducta de exploración (medida por el nivel de locomoción dentro de la arena) en la tarea de campo abierto.

Por otra parte, fue interesante demostrar que la exposición crónica al AE previene la disminución de la neurogénesis que se observa en el envejecimiento normal (Kuhn et

al., 1996; Kronenberg et al., 2006). Así, nuestros datos sugieren que el AE promovió tanto el mantenimiento de la proliferación celular como la diferenciación hacia neurona. Estos cambios conductuales se asocian a cambios estructurales en el hipocampo y demostramos que algunos marcadores de plasticidad neuronal como es el establecimiento de nuevas sinapsis (que se puede valorar estudiando el contenido en sinaptofisina) se incrementó así como se mejoró la morfología en general de terminales sinápticas aisladas. También encontramos una relación entre el incremento de sinaptofisina y el incremento del contenido de las vesículas sinápticas en sinaptosomas de hipocampo de ratas de 21 meses expuestas al AE, lo que sugiere un efecto positivo en estos sitios que determinan la comunicación interneuronal y que parecen afectarse durante el envejecimiento. En relación a este dato existe controversia ya que algunos trabajos han reportado que no encuentran efectos del AE en los niveles de sinaptofisina (Bennett et al., 2006), mientras que otros muestran una regulación positiva del número de sinapsis (Rampon et al., 2000a, 2000b; Saito et al., 1994) así como del número de espinas dendríticas (Leenders et al., 2002; Moser y Trommald., 1994) y del contenido de vesículas sinápticas por efecto del AE (Nakamura et al., 1999). Probablemente estas diferencias estén determinadas por la edad de los animales, el sexo de los mismos, y el protocolo de enriquecimiento.

Por lo tanto podemos concluir que el estar expuesto a un AE durante un largo periodo de la vida aunque sea de manera intermitente, previene de algunos de los signos que acompañan al envejecimiento, probablemente porque promueve el mantenimiento de la capacidad plástica del cerebro, resultado de promover una constante adaptación a la complejidad y novedad que ofrece el AE.

X. CONCLUSIONES

1. Existe una relación directa entre nivel de actividad con el AE y los efectos que el AE promueve en el animal.
2. El estar expuesto a un AE disminuye los niveles de ansiedad de manera dependiente nivel de actividad con éste.
3. A mayor nivel de actividad en el AE mayor proliferación celular del hipocampo.
4. Existe una relación entre el nivel de actividad de los sujetos con el AE y sus niveles de testosterona en suero.

5. El estar expuesto a un AE durante toda la vida desde la juventud contrarresta la disminución de la neurogénesis asociada al envejecimiento natural, previene la disminución en la memoria de reconocimiento de objetos y evita algunas de las alteraciones morfológicas de las terminales sinápticas.

XI. PERSPECTIVAS

El presente trabajo muestra varias correlaciones entre los efectos de la exposición a un AE y eventos plásticos, en especial en la neurogénesis hipocámpal, sin embargo sería importante determinar el mecanismo que regula estos efectos así como ahondar más en qué parte del proceso de neurogénesis está involucrado en las diferencias entre los individuos expuestos al AE. Por ejemplo si hay diferencias en los estadios de diferenciación, si un precursor es más sensible en un grupo u otro ó bien, si se observan diferencias en la expresión de factores de crecimiento que regulan los efectos del AE.

IX. REFERENCIAS

Absil P, Pinxten R, Balthazart J, Eens M (2003). Effect of age and testosterone on autumnal neurogenesis in male European starlings (*Sturnus vulgaris*). *Behav Brain Res* 143:15–30.

Amrein I, Slomianka L, Poletaeva II, Bologova NV, Lipp HP (2004). Marked species and age-dependent differences in cell proliferation and neurogenesis in the hippocampus of wild-living rodents. *Hippocampus*.

Altman J. (1962). Are new neurons formed in the brains of adult mammals?. *Science* 135: 1127–1128.

Altman J, Das GD (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124: 319–335.

von Bohlen und Halbach O. (2007). Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell Tissue Res* 329:409–420.

Benaroya-Milshtein N, Hollander N, Apter A, Kukulansky T, Raz N, Wilf A, Yaniv I (2004). Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. *Eur J Neurosci* 20:1341–1347.

Bennett J, McRae P, Levy L, Frick K (2006). Long-term continuous, but not daily, environmental enrichment reduces spatial memory decline in aged male mice. *Neurobiol of Learn and Mem* 85: 139–152.

Biebl M, Cooper CM, Winkler J, Kuhn HG (2000) Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neurosci. Lett* 291: 17–20.

Bruel-Jungerman E, Laroche S, Rampon C. 2005. New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. *Eur J Neurosci* 21:513–521.

Brandt MD, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G, Reuter K, Bick-Sander A, von der Behrens W, Kempermann G (2003). Transient calretinin-expression defines early

postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Mol Cell Neurosci* 24: 603-613.

Cameron H. A. Gould E (1994) Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. *Neurosci* 61: 203-209.

Cameron HA, McKay RD (1999). Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nat Neurosci* 2: 894–897.

Churchill JD, Galvez R, Colcombe S, Swain RA, Kramer AF, Greenough WT (2002). Exercise experience and the aging brain. *Neurobiol Aging* 23:941–955.

Clark R E, Zola S M, Squire L R (2000). Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. *The Journal of Neuroscience* 20:8853–8860.

Clark, R. E., Kuczenski, R., & Segal, D. S. (2007). Escalating dose, multiple binge methamphetamine regimen does not impair recognition memory in rats. *Synapse* 61: 515–522.

Colcombe S J, Kramer A F, Erickson K I, Scalf P, McAuley E, Cohen N J (2004a). Cardiovascular fitness cortical plasticity and aging. *PNAS* 101: 3316–3321.

Colcombe SJ, Kramer AF, McAuley E, Erickson KI, Scalf P (2004b). Neurocognitive aging and cardiovascular fitness: Recent findings and future directions. *Journal of Molecular Neuroscience* 24: 9–14.

Dayer, A.G., Ford, A.A., Cleaver, K.M., Yassaee, M. & Cameron, H.A. (2003) Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* 460: 563–572.

Dupret D, Revest JM, Koehl M, Ichas F, De Giorgi F, Costet P, Abrous DN, Piazza PV (2008). Spatial Relational Memory Requires Hippocampal Adult Neurogenesis. *PLoS ONE* 9:1959.

Fabel K, Fabel K, Tam B, Kaufer D, Baiker A, Simmons N, Kuo C, Palmer T (2003) VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci*. 18: 2803-2812.

Flannelly K, Lore R. 1977. The influence of females upon aggression in domesticated male rats (*Rattus norvegicus*). *Anim Behav* 25:654–659.

Filippov V, Kronenberg G, Pivneva T, Reuter K, Steiner B, Wang LP, Yamaguchi M, Kettermann H and Kempermann G : Subpopulations of nestin-expressing 3progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes: *Mol. Cell Neurosci.* 2003, 23: 373-382.

Fowler Ch, Liu Y, Ouimet Ch, Wang Z (2002). The effects of social environment on adult neurogenesis in the female prairie vole. *J Neurobiol* 51:115–128.

Frick KM, Stearns NA, Pan JY, Berger-Sweeney J (2003). Effects of environmental enrichment on spatial memory and neurochemistry in middle aged mice. *Learning and Memory* 10: 187–198.

Friedland R, Fritsch T, Smyth K A, Koss E, Lerner A J, Chen CH (2001). Patients with Alzheimer's disease have reduced activities in midlife compared with healthy control-group members. *PNAS* 98: 3440–3445.

Fukuda S, Kato F, Tozuka Y, Yamaguchi M, Miyamoto Y, Hisatsune T (2003) Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *J. Neurosci* 23:9357–9366.

Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LAM and Fuchs E (1997) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci.* 17:2492–2498.

Gould E, Gross Ch (2002) Neurogenesis in the adult mammals: some progress and problems. *J Neurosc.* 22: 619-623.

Green S, Hodges H. 1991. Models of anxiety. In: Willner P, editor. *Behavioral Models in Psychopharmacology: Theoretical, Industrial, and Clinical Perspectives*. Cambridge: Cambridge University Press.

Jankowsky J, Melnikova T, Fadale J, Xu G, Slunt G, Gonzales V, Younkin L, Younkin S, Borchelt D, Savonenko, A. (2005) Environmental enrichment mitigates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosc* 25:5217–5224.

Jessberger, S. and Kempermann, G. (2003) Adult-born hippocampal neurons mature into activity-dependent responsiveness. *Eur.J. Neurosci.* 18, 2707–2712

Kaplan MS, Hinds JW (1977) Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197:1092–1094.

Kramer AF, Erickson KI and Colcombe SJ (2006). Exercise, cognition and aging brain. *J. of App Physiol* 10:1237-1242.

Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386, 493–495.

Kempermann G, Kuhn HG, Gage FG (1998) Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J Neurosc.*, 18:3206-3212.

Kempermann G (2002a) Why new neurons? possible functions for adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosc.* 22: 635–638.

Kempermann G, Gast D, Gage FH (2002b) Neuroplasticity in Old Age: Sustained Fivefold Induction of Hippocampal Neurogenesis by Long-term Environmental Enrichment. *Ann Neurol.*52:135–143.

Kempermann G, Gast D, Kronenberg G, Yamaguchi M, Gage F (2003) Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development* 130:391-399.

Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G (2004). Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci* 27:447–452.

Kempermann G (2006) *Adult Neurogenesis: Stem Cells and Neuronal Development in the Adult Brain.* Oxford University Press.

Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J. Neurosci.* 16: 2027-2033.

Kuhn HG, Biebl M, Wilhelm D, Li M, Friedlander RM, Winkler J (2005). Increased generation of granule cells in adult Bcl-2-overexpressing mice: a role for cell death during continued hippocampal neurogenesis. *Eur J of Neurosci* 22: 1907–1915.

Kronenberg G, Reuter K, Steiner B, Brandt M, Jessberger S, Yamaguchi M y Kempermann G (2003) Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *J of Comparative Neurology* 467:455–463.

Kronenberg G, Bick-Sander A, Buel E, Wolf C, Ehninger D, Kempermann G (2006) Physical exercise prevents age-related decline in precursor cell activity in the mouse dentate gyrus. *Neurobiol Aging* 27:1505-1513.

Lazarov O, Robinson J, Tang Y P, Aristón I S, Korade-Mirnic Z, Lee V M, Hersh L B, Sapolsky R M, Mirnic K, Sisodia S S. (2005). Environmental enrichment reduces A- β levels and amyloid deposition in transgenic mice. *Cell* 120:701-713.

Leenders A G M, Scholren G, De Lange R P J, Lopes Da Silva F H, Ghijsen W E J M (2002). Sequential changes in synaptic vesicle pools and endosome-like organelles during depolarization near the active zone of central nerve terminals. *Neuroscience* 109; 195–206.

Leal-Galicia P, Saldívar-González A, Morimoto S and Arias C (2007). Exposure to environmental enrichment elicits differential hippocampal cell proliferation: role of individual responsiveness to anxiety. *Dev Neurobiol* 67:395-405.

Lemaire V, Koehl M, Le Moal M, Abrous DN (2000) Prenatal stress produces learning deficits associated with inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *PNAS* 97: 11032-11037 .

Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RDG (1990). CNS Stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60:585–595.

Lois C, Alvarez-Buylla (1993) Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *PNAS* 90:2074-2077.

Lösher W, Vetter M, Böhme G, Stoltenburg-Didinger G. (1985). In vivo effects of anticonvulsant drugs on nerve terminal (synaptosomal) GABA levels in 11 brain regions of the rat. *Journal of Neural Transmission*, 63, 157–167.

Louissaint A Jr, Rao S, Leventhal C, Goldman SA (2002). Coordinated interaction of neurogenesis and angiogenesis in the adult songbird brain. *Neuron* 34:945–960.

McEwen BS, Weiss JM, Schwartz LS (1968) Selective retention of corticosterone by limbic structures in rat brain. *Nature* 220:911-912.

McEwen B (1999) Stress and hippocampal plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* 22:105–22

Miller MV, Nowakowski RS(1988) Use of bromodeoxyuridine-immunohistochemistry to examine the proliferation, migration and time of origin of cells in the central nervous system. *Brain Res* 457: 44-52.

Moser M, Trommald Andersen P (1994). An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests the formation of new synapses. *PNAS* 91:12673–12675.

Mullen RJ, Buck CR, Smith AM (1992) NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*, 116:201–211.

Nakamura H, Kobayashi S, Ohashi Y, Ando S (1999). Age-changes of brain synapses and synaptic plasticity in response to an enriched environment. *J Neurosci Res* 56: 307–315.

Nilsson M, Perfilieva E, Johansson U, Orwar O y Eriksson PS. (1999) Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *J Neurobiol* 39: 569-578.

Nowakowski RS, Lewin SB, Miller MW (1989) Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. *J Neurocytol*, 18: 311-318.

Palmer TD, Takahashi J, Gage FH (1997). The adult rat hippocampus contains premordial neural stem cells. *Mol Cell Neurosci.* 8:389–404.

Petreanu, L. y Alvarez-Buylla, A. (2002) Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *J. Neurosci* 22:6106–6113.

Rakic P (2002). Adult neurogenesis in mammals: an identity crisis. *J Neurosci.* 22: 614-618.

Rampon C, Tang Y P, Goodhouse J, Shimizu E, Kiyin M, Tsien J Z (2000a). Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nature Neurosci* 3: 238–244.

Rampon C, Jiang C H, Dong H, Tang Y P, Lockhart D J, Schultz P G, et al. (2000b). Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain. *PNAS* 97: 12880–12884.

Rao MS y Shetty AK (2004) Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus. *Eur. J Neurosc.* 19: 234-246.

Renner MJ, Rosenzweig MR, (1986) Social interactions among rats housed in grouped and enriched conditions. *Dev Psychobiol* 19:303-313.

Rosenzweig, M. R. (1966). Environmental complexity, cerebral change, and behavior. *Am. Psychol.* 21, 321–332.

Sahay A, Hen R (2007) Adult hippocampal neurogenesis in depression. *Nat. Neurosci.* 10: 1110–1115.

Saito S, Kobayashi S, Ohashi Y, Igarashi M, Komiya Y, Ando S (1994). Decreased synaptic density in aged brains and its prevention by rearing under enriched environment as revealed by synaptophysin contents. *J of Neurosci Res* 39: 57–62.

Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R (2003) Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301:805– 809.

Sasco A J, Paffenbarguer R S, Gendre, I, Wing A L (1992). The role of physical exercise in the occurrence of Parkinson's disease. *Archives of Neurology* 49: 360–365.

Shors TJ, Miesegaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E (2001) Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* 410:372–376.

Shors TJ, Townsend D, Zhao M, Kozorovitskiy Y, Gould E. (2002) Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus* 12: 578–584.

Snowdon D A, Kemper S J, Mortimer J A, Greiner L H, Wekstein D R, Markesbery, W. R. (1996). Linguistic ability in early life and cognitive function and Alzheimer's disease in late life findings from the nun study. *JAMA* 275: 528–532.

Tamashiro KL, Nguyen MM, Fujikawa T, Xu T, Yun Ma L, Woods SC, Sakai RR (2004). Metabolic and endocrine consequences of social stress in a visible burrow system. *Physiol Behav* 80:683–693.

Treit D (1985). Animal models for the study of anti-anxiety agents: A review. *Neurosci Biobehav Rev* 9:203–222.

van Praag H, Kempermann G, Gage FH (2000). Neuronal consequences of environmental enrichment. *Nature Rev Neurosci* 1: 191-198.

van Praag H, Kempermann G, Gage FH (1999). Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature Neurosci* 2: 266–270.

van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415:1030-1034.

van Praag H, Shubert T, Zhao C, Gage FH (2005) Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci* 25:8680–8685.

Will, B. E., Rosenzweig, M. R., Bennett, E. L., Hebert, M., & Morimoto, H. (1977). Relatively brief environmental enrichment aids recovery of learning capacity and alters brain measures after postweaning brain lesions in rats. *Jour of Comp Physiol Psychol* 91: 33–50.

Wilson, R. S., Mendes DeLeon, C. F., Barnes, L. L., Schneider, J. A., Bienias, J. L., Evans, D. A., et al. (2002). Participation in cognitively stimulating activities and risk of incident Alzheimer disease. *J of the Am Med Associ* 287:742–748.

Winner B, Cooper-Kuhn CM, Aigner R, Winkler J, Kuhn HG (2002) Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 16:1681–1689.

Wolf HK, Buslei R, Schmidt-Kastner R, Schmidt-Kastner PK, Pietsch T, Wiestler OD, Blümcke I (1996) NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology. *J Histochem Cytochem* 44:1167–1171.

Wolf S, Kronenberg G, Lehmann K, Blankenship A, Overall R, Staufenbiel M, Kempermann G (2006). Cognitive and physical activity differently modulate disease

progression in the amyloid precursor protein (app)-23 model of Alzheimer's disease. *Biol Psych* 60: 1314–1323.

Yamaguchi M, Saito H, Suzuki M, Mori K (2000). Visualization of neurogenesis in the central nervous system using nestin promoter-GFP transgenic mice. *Neuroreport* 11:1991–1996.

XIII ARTICULOS DERIVADOS DEL PROYECTO DE TESIS.

Leal-Galicia P, Castañeda-Bueno M, Quiroz-Baez R and Arias C (2008). Long-term exposure to environmental enrichment since youth prevents recognition memory decline and increases synaptic plasticity markers in aging. *Neurobiology of Learning and Memory* 90: 511–518.

Leal-Galicia P. y Arias C. (2008) Efecto del enriquecimiento ambiental a nivel conductual, celular y molecular En: *Lingüística, Neuropsicología y Neurociencias ante los trastornos del desarrollo infantil*. Eds. Escotto-Cordova, A., Pérez- Mendoza, M., Sánchez-Cortés, N.A.. (Mexico: UNAM-FES Zaragoza), 291-304. ISBN 978-970-32-4629-8.

Leal-Galicia P, Saldívar-González A, Morimoto S and Arias C. (2007). Exposure to environmental enrichment elicits differential hippocampal cell proliferation: role of individual responsiveness to anxiety. *Developmental Neurobiology* 67(4):395-405.

Cover image.