



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

**PERSISTENCIA DE LOS BENEFICIOS DEL ENRIQUECIMIENTO  
AMBIENTAL SOBRE LA NEUROPLASTICIDAD, EL PROCESO DE  
APRENDIZAJE-MEMORIA Y LA PREVENCIÓN DE CONDUCTAS  
DE ANSIEDAD Y DEPRESIÓN EN EL RATÓN**

**TESIS**

Para obtener el título de  
**Licenciada en Psicología**

**PRESENTA:**

Granados Juárez Andrea

**DIRECTOR**

Dr. Ramírez Rodríguez Gerardo Bernabé

**Ciudad Universitaria, CDMX., 2020**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

*“Este mensaje no es solamente para situaciones desesperadas, también es para situaciones placenteras. No es sólo para cuando te sientes derrotado, también lo es para cuando te sientas victorioso. No es sólo para cuando eres el último, sino también para cuando eres el primero”.*

*El rey abrió el anillo y leyó el mensaje... **“esto también pasará”***

## **Agradecimientos**

Agradezco primeramente a mis padres Raquel y Tobías, por darme todo el apoyo, la paciencia, la comprensión y estar conmigo toda la vida, ellos me han guiado en este camino y sin ellos nada de esto habría sido posible. Agradezco a mis hermanos Ricardo y Emiliano por ser mis compañeros de vida y cuidarme, siempre cuidándonos mutuamente. A mis abuelos por todo su cariño y motivación para completar satisfactoriamente mis estudios.

Agradezco a mis compañeros de carrera que siempre aportaron mucho con sus comentarios, opiniones y conocimiento en las clases y a los que llegue a conocer más allá, que fueron mis amigos en la carrera Ale, Jazmín Tabatha, Mariana, Diana Kari, Silvi, Paulina, Brenda, por mencionar algunos, con los que nos apoyamos en todos los semestres, materias y en la vida, gracias.

Agradezco al Dr. Gerardo por darme la oportunidad de entrar y desarrollar un proyecto en el Laboratorio de Neurogénesis donde se llevo a cabo el desarrollo de esta tesis, también agradezco a los trabajadores de este laboratorio a Leonardo por todos sus consejos, enseñanzas y paciencia, a Edith y Arturo por sus consejos y apoyo; también agradezco a los estudiantes de este laboratorio por brindarme su apoyo, consejos y amistad.

Agradezco a los docentes que forman parte del comité sinodal, cada uno de los ellos desde sus áreas de formación y de investigación me aportaron bastante para poder concluir el trabajo.

Finalmente agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Psicología por acogerme durante todos estos años, aportándome con el conocimiento transmitido por sus docentes de alta calidad y permitirme, ahora, concluir mis estudios.

***Por todas sus enseñanzas y apoyo de todos.***

***Infinitas gracias.***

## Índice

1. Abreviaturas .....	4
2. Resumen .....	5
3. Introducción .....	6
3.1. Hipocampo, estructura y función.....	6
3.2. Neuroplasticidad .....	10
3.3. Proceso neurogénico .....	11
3.4. Enriquecimiento ambiental.....	15
3.5. Enriquecimiento ambiental y neurogénesis.....	15
3.6. Enriquecimiento ambiental y duración de los efectos.....	16
4. Justificación .....	17
5. Objetivos .....	18
5.1. General .....	18
5.2. Específicos.....	18
6. Hipótesis .....	18
6.1. Hipótesis específicas.....	18
7. Metodología .....	19
7.1. Animales .....	19
7.2. Condiciones de alojamiento .....	19
7.3. Pruebas conductuales .....	20
7.4. Sacrificio .....	25
7.5. Inmunihistoquímicas .....	26
7.6. Cuantificación .....	26
7.7. Análisis estadístico.....	27
8. Resultados .....	28
8.1. Rotarod .....	28
8.2. Campo abierto .....	29
8.3. Laberinto elevado en cruz .....	31
8.4. Evitación pasiva .....	33
8.5. Doblecortina .....	35
8.6. Categorías.....	39
9. Discusión .....	42
9.1. Conducta .....	43
9.2. Doblecortina .....	44
10. Conclusión .....	45
11. Referencias .....	47

## 1. Abreviaturas

ANOVA: Análisis de varianza

AVT: área tegmental ventral

C: categoría

CA: Cuerno de Amón

CCG: capa de células granulares

CE: corteza entorrinal

CM: capa molecular

CP: capa polimórfica

DA: dopamina

DAB: diaminobenzidina

DCx: Doblecortina

EA: Enriquecimiento ambiental

ECl: estrés crónico impredecible

GABA: ácido gamma-aminobutírico

GD: Giro dentado

GFAP: proteína ácida fibrilar glial

HD: hipocampo dorsal

HV: Hipocampo ventral

NCAM: molécula de adhesión celular

S: sesión

SC: solución de citratos

SNC: sistema nervioso central

PSA-NCAM: molécula de adhesión celular neuronal polisializada

T: tiempo

VP: vía perforante

ZSG: zona subgranular

## 2. Resumen

La exposición a estímulos como el enriquecimiento ambiental (EA), y la actividad física produce beneficios en roedores. Además, el EA promueve formación de nuevas neuronas en el giro dentado (GD) del hipocampo. La neurogénesis es un proceso que involucra diferentes eventos celulares tales como: división de las células madre, proliferación de neuroblastos, migración y sobrevivencia celular, así como la maduración dendrítica, elongación axonal y la integración de las neuronas nuevas a circuitos neuronales existentes. Los cambios en la plasticidad cerebral también están asociados a cambios en el comportamiento. Estos efectos se han observado y estudiado durante la exposición al EA, de manera inmediata a la exposición o en tiempos cortos. Sin embargo, se desconoce si dichos efectos logran mantenerse en tiempos posteriores al cese del EA. Por ello, es importante investigar la duración de los efectos benéficos del EA sobre la plasticidad y sobre la prevención de conductas asociadas con la depresión y la ansiedad. En este trabajo se estudió el efecto de la exposición por un mes a un EA y posteriormente, se evaluaron conductas asociadas con la ansiedad y con el proceso de aprendizaje y memoria aversiva: 1) de manera inmediata al cese del EA, 2) al mes y 3) a los tres meses, finalmente los sujetos fueron eutanizados por decapitación para obtener su cerebro y se realizó análisis de inmunohistoquímicas para evaluar el proceso neurogénico. Los resultados indican que el EA mejoró el proceso de aprendizaje-memoria e incrementó la neurogénesis hipocampal, hasta los tres meses. En conjunto, los resultados indicaron que los efectos neurogénicos provenientes del EA persisten por tiempos prolongados, favoreciendo el proceso de aprendizaje y memoria aversiva.

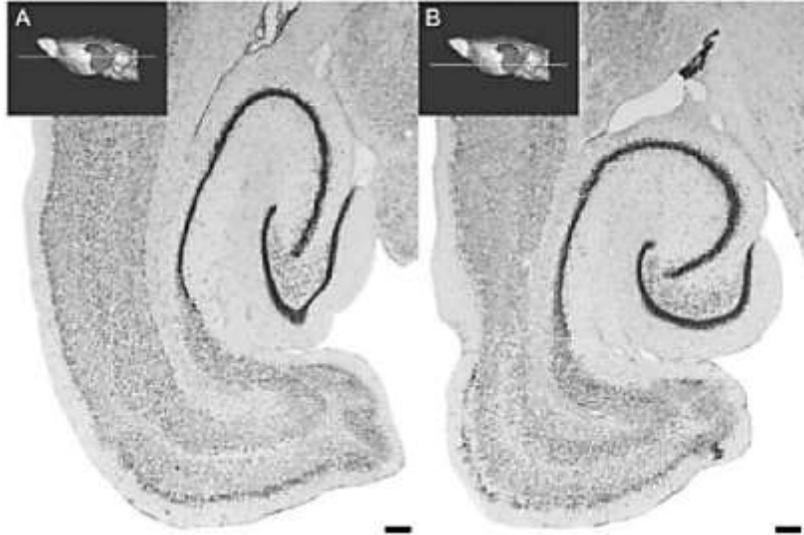
### 3. Introducción

#### 3.1. Hipocampo, estructura y función.

El hipocampo forma parte del sistema límbico que comprende la corteza olfativa, amígdala, área septal, cuerpos mamilares y los núcleos talámicos anteriores. El hipocampo es una estructura subcortical, localizada en los primates en lóbulo temporal medio, es una estructura compleja y de forma cilíndrica organizada en regiones: giro dentado (GD), cuerno de Amón 1, 2, y 3 (CA3, CA2 y CA1) (Amaral y Witter 2007)

El GD cuenta con tres capas principales, la capa molecular (CM) en la cual se encuentran las dendritas de las células granulares y la ocupada por las fibras que de ahí proyectan. La CM cuenta con un pequeño grupo de interneuronas, mientras que la capa de células granulares (CCG) está constituida por grandes cúmulos de somas de células granulares (Amaral y Witter 2007). La capa polimórfica (CP) está formada principalmente por células de canasta que son un tipo de interneuronas inhibitorias (Ribak et al., 1986) inmuno-reactivas para los marcadores de neuronas GABAérgicas y hacen sinapsis simétricas (Soriano et al., 1989)

El GD dentro de la formación hipocámpica presenta una estructura en forma de “C”, y en los ratones corre rostralmente al núcleo septal y caudalmente a la corteza temporal; de tal modo que la longitud de éste eje se llama septo-temporal, al eje en un ángulo recto respecto al eje septo-temporal se conoce comúnmente como eje transversal. El GD por sí solo tiene una estructura relativamente similar en la totalidad del eje septo-temporal de la formación hipocámpica. Sin embargo, éste tiene forma de “V” en el polo septal, mientras que en el polo temporal adopta forma de “U” (**Figura 1**) (Amaral y Witter 2007).



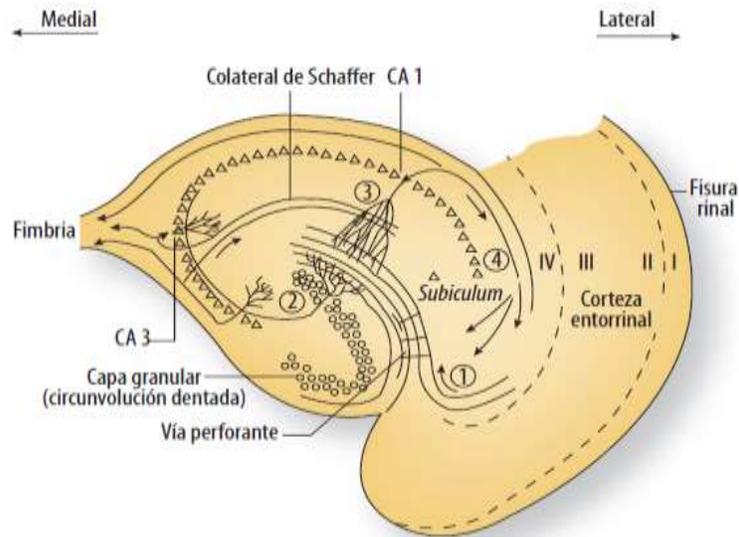
**Fig. 1. Eje septo-temporal.** La imagen de la izquierda muestra un corte transversal de la región septal (dorsal) del hipocampo con forma de “V”, mientras que en la de la derecha se muestra un corte transversal en la región temporal (ventral) donde el GD adopta forma de “U”. Tomada y modificada de Amaral y Witter 2007

La organización funcional básica en el hipocampo consiste en un circuito trisináptico en el cual las sinapsis son principalmente excitadoras. Este circuito empieza en las fibras perforantes derivadas de la corteza entorrinal conectando con las células granulares del (GD), la siguiente proveniente de los axones de éstas células por un tracto llamado fibras musgosas formando sinapsis con las células piramidales de CA3, finalmente, los axones de CA3 forman las colaterales de Schaffer conectando sinápticamente con las células de CA1, las cuales proyectan nuevamente a la corteza entorrinal de manera directa e indirecta través del subiculum, cerrando el circuito trisináptico (Amaral et al., 1989; Cooper et al., 2002.)

El GD recibe pocas aferencias subcorticales, la mayor cantidad de proyecciones proviene de núcleos septales (Amaral et al., 1985; Kjelstrup et al., 2002). Las fibras septales inervan principalmente de la capa polimórfica, particularmente en una estrecha región subyacente a la capa de células granulares; estas proyecciones están ampliamente distribuidas a través de la CM.

Mientras que la mayoría de las aferencias que tiene el GD provienen de la corteza entorrinal a través de la vía perforante (Ramón, 1893; Dias et al., 2012). Un porcentaje menor viene de las capas V y VI de la corteza entorrinal (Steward et al.,

1976; Deller et al., 1996; Kjelstrup et al., 2002). Por otra parte, las fibras de la vía perforante se originan en el área lateral de la corteza entorrinal y terminando en la CM, mientras que las que se originan en la capa medial entorrinal, termina en la mitad de la CM (**Figura 2**).



**Fig. 2. Esquema de los circuitos del hipocampo.** Los axones de las neuronas de la capa II de la corteza entorrinal (CE) proyectan hacia el GD a través de la vía perforante (VP) al GD que envía sus proyecciones por las fibras musgosas a CA3, sus neuronas piramidales envían sus proyecciones a través de las colaterales de Schaffer a CA1. A su vez las células de CA1 envían sus proyecciones a las neuronas de la corteza entorrinal. Tomado de Tresguerre, 2010.

El GD también recibe entradas del *locus coeruleus*, las fibras noradrenérgicas terminan principalmente en la capa polimórfica del GD y se extienden dentro de la región de CA3. De igual manera recibe proyecciones serotoninérgicas provenientes de los núcleos de rafé, que terminan de manera más pronunciada en la capa polimórfica (Kjelstrup et al., 2002).

Las funciones del hipocampo dentro del sistema límbico son principalmente tres:

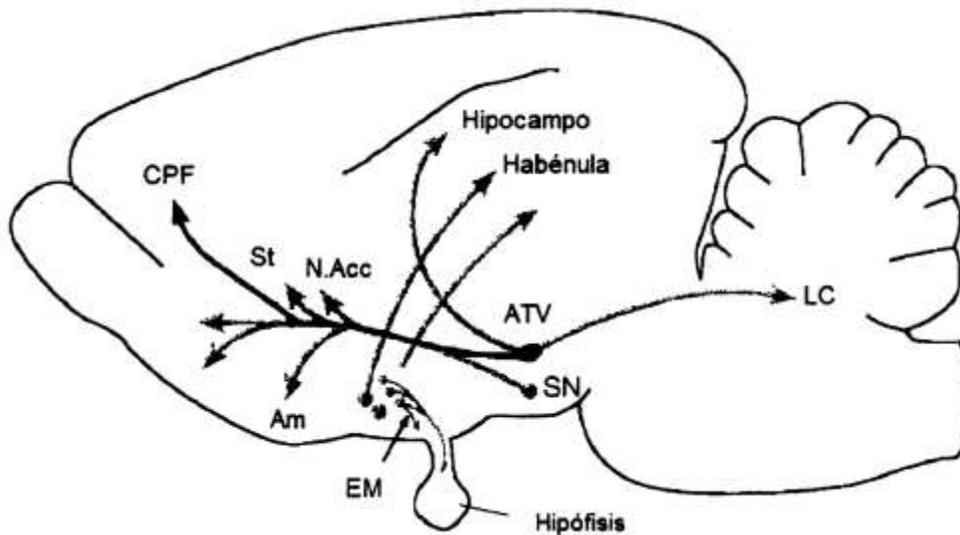
1. Memoria: el complejo poli sináptico se encarga de consolidarla memoria, evidencias tanto experimentales como en pacientes con daños en la formación del hipocampo indican que esta región está implicada en la formación y consolidación de memorias explícitas (Scoville et al., 2000; Mishkin et al., 1997; Dias et al., 2012), es decir, de la formación de memorias

a largo plazo (Milner et al., 1998). Esa información se transfiere después a la neocorteza, donde se almacena. La consolidación de la memoria parece producirse por un proceso de potenciación a largo plazo (long-term potentiation, LTP, por sus siglas en inglés). Las funciones del hipocampo están dadas por diferencias a lo largo de su eje septo-temporal. Así, el hipocampo dorsal (HD) está más involucrado en tareas de memoria espacial y aprendizaje asociativo (Tanti et al., 2012), para su posible estudio se ocupan los modelos basados en los estudios de B. F. Skinner, quién desarrolló un modelo de aprendizaje basado en conductas condicionadas y paradigmas en los que se incluyen procedimientos de reforzamiento o castigo. Mientras que el hipocampo ventral (HV) está más relacionado con conductas emocionales (Kjelstrup et al., 2002; Tanti et al., 2012).

2. Motivación: en el sistema nervioso central (SNC) se ha señalado a la dopamina (DA) como el principal neurotransmisor de la motivación. Las vías por las cuales se lleva a cabo principalmente la distribución de DA en el encéfalo son cuatro: 1) la nigroestriatal, que se origina en la sustancia nigra y proyecta hacia el estriado (núcleo caudado y putamen) participando en el control de los movimientos, 2) la mesocortical que va del área ventral tegmental (AVT) a la corteza y que está implicada en procesos cognitivos, 3) la tuberoinfundibular que va desde las neuronas del núcleo arcuato en el hipotálamo hasta la glándula hipofisaria, regulando la liberación de ciertas hormonas, y por último 4) la vía mesolímbica que va desde la AVT hacia el núcleo accumbens formando así la vía de recompensa (Carlson, 2015), **(Figura 3)**.

Diversos estudios sobre adicciones y toma de decisiones han reportado que la vía meso-límbica es clave para que ocurran estas conductas asociadas con adicciones. La descripción de Solomon et al. (1974) se señala que la motivación, en especial sus aplicaciones en las conductas adictivas estaban dada por conductas hedónicas, afectivas y emocionales, que ocurrían dentro del SNC (Solomon et al., 1974; Edelman et al., 2018), dicha teoría sigue

siendo la base de las investigaciones que se enfocan en las conductas adictivas.



**Fig. 3. Esquema de las vías dopaminérgicas.** Las vías de distribución de la DA en el cerebro de rata. Tomado de Fuster, 2000.

3. Conductuales: Comprende una especie de “*switch*” emocional que involucra conexiones con la amígdala. Además, su lesión o estimulación se ha relacionado con conductas de defensa, ataque y furia, ambas forman parte del sistema emocional, que engloba áreas del encéfalo relacionadas con la emoción y las vías que las interconectan. Por ende se asocia con conductas ansiosas o depresivas (Edelmann et al., 2018)

### 3.2. Neuroplasticidad

La Organización Mundial de la Salud (1982) define el término neuroplasticidad como la capacidad de las células del sistema nervioso para regenerarse anatómica y funcionalmente, después de estar sujetas a influencias patológicas, ambientales o del desarrollo, incluyendo traumatismos y enfermedades

A nivel neuronal los cambios estructurales pueden ser visualizados a través de un incremento del árbol dendrítico y del número de espinas dendríticas, que facilitan y fortalecen los contactos sinápticos y en consecuencia la comunicación entre las neuronas (Fortin et al., 2002). El aprendizaje puede considerarse como una

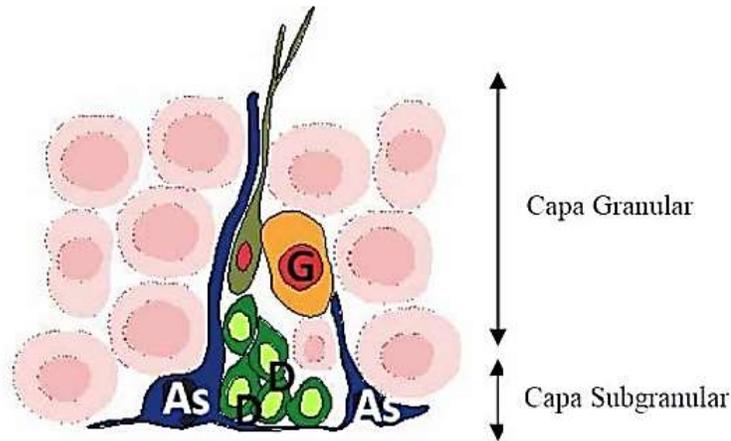
modificación estructural y funcional del sistema nervioso que da como resultado un cambio en la conducta relativamente permanente (Knierim, 2015). Como se ha mencionado el hipocampo es crucial para la formación de la memoria, en este sitio ocurre la generación de nuevas células, a este fenómeno se le conoce como neurogénesis y es considerado parte de la neuroplasticidad (Knierim, 2015).

### 3.3. Proceso neurogénico

El estudio de la generación de neuronas en el cerebro adulto tiene sus inicios en los trabajos del doctor Joseph Altman. En esos trabajos se reportó la presencia de células que incorporaron timidina tritiada en el GD del hipocampo adulto de roedores (Altman, 1965; Baptista et al., 2018).

El proceso de neurogénesis incluye diferentes eventos que son:

1. *Proliferación asimétrica de las células troncales o tipo 1.* Estas células troncales con características de la glía radial (Kempermann et al., 2004; Duan et al., 2015), tienen filamentos intermedios como la nestina y la proteína ácida fibrilar glial, (GFAP, por sus siglas en inglés). Durante su división dan origen a una célula tipo 1 y a una célula tipo 2. La morfología de estas células se caracteriza por tener una proyección radial hacia la CM y el soma localizado en la zona subgranular. También, es parecida a las células de la glía, con un citoplasma triangular, alargado o anguloso que alcanza la capa de células granulares. (Kempermann et al., 2004). Además, tienen la capacidad de autor renovación. (**Figura 4**). Hallazgos como los de Song H. et al. (2002), demostraron que los astrocitos adultos del hipocampo son capaces de regular la neurogénesis al distinguir a las células madre para que adopten un destino neuronal, regulan la formación de sinapsis y la transmisión sináptica, lo cual refuerza que los astrocitos tienen un papel regulador activo, más que meramente un papel de apoyo tradicionalmente asignados a ellos en el SNC maduro (Kempermann et al., 2014).



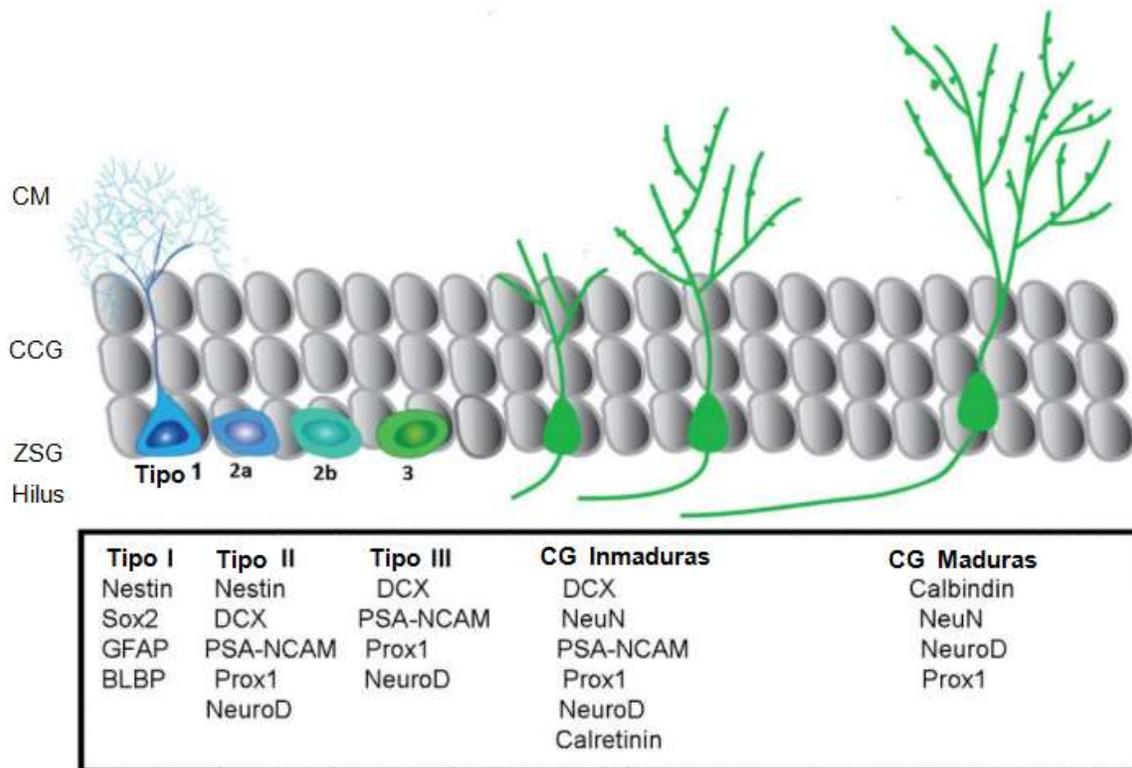
**Fig. 4. Esquema de glía radial.** Organización y tipos celulares en la zona subgranular (ZSG). Esquema de una sección coronal del cerebro de ratón adulto en donde se muestra el GD y los tipos celulares en la ZSG. Las células azules corresponden con los astrocitos tipo I, que al dividirse dan lugar a las células progenitoras D (verdes) y que maduran dando lugar a nuevas células granulares G (rojas). Tomado de Carrión, 2007.

2. *Proliferación simétrica de las células progenitoras tipo 2.* Estas células forman a la población de rápida amplificación y se caracterizan de expresar la proteína GFAP y el factor de transcripción asociado a multipotencia Sox2. La morfología de estas células se caracteriza por proyecciones cortas y alineadas de manera horizontal a la capa granular del GD. Además, expresan de manera temporal diferentes marcadores proteicos que permiten hacer una subclasificación en células 2a (que expresan GFAP y Sox2) y en células 2b que expresan a la proteína doblecortina y al factor de transcripción NeuroD (Kempermann et al., 2004). De tal modo que las células tipo 2b dan origen a las células tipo 3 o neuroblastos (Kempermann et al., 2004). Estas células muestran características de células progenitoras ya que algunas de ellas co-expresan Ki-67 (un marcador de proliferación celular) y por lo tanto son capaces de dividirse (Espósito et al., 2005; Cimadamore et al., 2013). Por último, el tipo celular 3, el cual expresa doblecortina y NeuN. Los tres tipos celulares expresan la proteína polisializada de NCAM (PSA-NCAM) (Kim et al., 2014) **(Figura 5)**.

3. *Generación de neuronas inmaduras.* Las células tipo 3 se caracterizan por expresar a la proteína doblecortina, que se asocia a los microtúbulos (Plumpe et al., 2006). Estas células pueden permanecer como neuroblastos o bien, salir del ciclo celular para dar origen a las neuronas inmaduras que expresan la proteína doblecortina en sus árboles dendríticos y en las fibras musgosas que proyectan hacia CA3 (Knierim et al., 2015). Posteriormente, las células de nueva generación expresan a la proteína calretinina y continúan con su fase de maduración (Kempermann et al., 2004; Brandt et al., 2003). Las primeras conexiones con CA3 ocurren dentro de los primeros 4-10 días después del nacimiento de una nueva célula (Markakis et al., 1999), durante las cuales estas nuevas células empiezan a recibir aferencias GABAérgicas y no glutamatérgicas (Esposito et al., 2005; Overstreet et al., 2005; Ge et al., 2006) por lo que el neurotransmisor GABA juega un papel crucial para el desarrollo dendrítico de estas células.

4. *Maduración neuronal.* En este punto las neuronas de nueva generación adquieren un fenotipo maduro y expresan a la proteína calbindina (Kempermann, 2012). Esta proteína se localiza en las fibras musgosas y en la capa granular. Además, las neuronas maduras presentan características electrofisiológicas presentes en las células granulares del GD. La Calbindina se expresa en todas las neuronas maduras del GD, en la mayoría de las neuronas piramidales de CA1 y CA2 y se usa como marcador de la última etapa de la neurogénesis adulta, para marcar neuronas granulares maduras (Rami et al., 1987; Eriksson et al., 1998; Liu et al., 1998; Nilsson et al., 1999; Dominguez et al., 2003), pero no junto a PSA-NCAM (Dominguez et al., 2003) ni junto a calretinina que marcaba también neuronas postmitóticas inmaduras (Nacher, et al., 2002; Brandt et al., 2003) **(Figura 5)**.

El proceso descrito anteriormente sugiere que conforme ocurre la replicación, migración y diferenciación las nuevas neuronas se van incorporando al lugar que ocupará permanentemente y que durante este proceso existe una expresión transitoria de proteínas que sirven como marcadores de cada etapa del proceso (Kempermann, 2012).



**Fig. 5. Linajes celulares encontrados en la ZSG del GD en el hipocampo.** Los astrocitos radiales (células tipo I) son considerados las células madre neurales de esta región, las cuales dan origen a precursores neuronales (células tipo II) que migran hacia las capas superiores, donde se diferencian en neuronas maduras (granulares posnatales). Este proceso dura aproximadamente 28 días y durante el transcurso del mismo los progenitores subgranulares expresan diferentes marcadores moleculares que permiten realizar su tipificación. Tomada y modificada de Kempermann, 2012

### 3.4. Enriquecimiento ambiental

El EA se refiere a las condiciones de la vivienda, ya sea jaulas domésticas o cajas exploratorias, que facilitan la estimulación sensorial, cognitiva y motora mejorada en relación con las condiciones estándar de vivienda. Las condiciones estándar de la vivienda a menudo varían entre laboratorios (Fernandes et al., 2014) y generalmente la vivienda estándar está constituida por un grupo de animales del mismo sexo sin ningún otro estímulo (Nithianantharajah et al., 2006).

En cambio, el EA se establece colocando a un grupo de roedores ( $n \geq 8$ ) en una caja que contiene objetos de diferentes formas, texturas y tamaños (Birch et al., 2013; Nilsson et al., 1999; Fernandes et al., 2014). El EA es un paradigma que

proporciona oportunidades constantes de exploración, interacción y desafíos cognitivos (Kempermann et al., 1997; Nithianantharajah et al., 2006).

### **3.5. Enriquecimiento ambiental y neurogénesis**

El término “enriquecimiento ambiental” como un proceso experimental fue propuesto por Hebb (1947). Uno de los primeros trabajos que reportan los beneficios del EA sobre la generación de neuronas en el GD del hipocampo fue publicado por Kempermann et al. (1997). En ese trabajo se describe que la exposición al EA demuestra que la neurogénesis incrementa cuando los animales se someten a un paradigma de EA. También han seguido resaltando el papel del EA sobre la plasticidad, encontrando que la exposición a un entorno enriquecido provoca cambios estructurales como son la arborización dendrítica, gliogénesis, neurogénesis y en el comportamiento como un aprendizaje mejorado (Praag et al., 1999). Estudios posteriores postulan al EA como un modulador de la neurogénesis adulta (Kempermann et al., 1997; kempermann et al., 2018).

En roedores, el ejercicio voluntario incrementa la proliferación, así como las etapas mitóticas y pos mitóticas este último en relación a las nuevas neuronas en el GD (Bonenfant et al., 2014). Además, el ejercicio voluntario favorece la eficacia sináptica en neuronas del GD y mejora el aprendizaje espacial de los roedores en el laberinto acuático de Morris (Liu et al., 2011; O’Callaghan et al., 2007; Bettio et al., 2017). Específicamente, se sabe que el ejercicio voluntario en una rueda para correr mejora la supervivencia de las neuronas recién nacidas en la circunvolución dentada, además de aumentar la potenciación del GD a largo plazo para la consolidación de la memoria (Praag et al., 1999). Mientras que el enriquecimiento dado por los túneles aumenta la ramificación dendrítica y la sinaptogénesis en la corteza y el hipocampo, también aumenta las pendientes de potencial postsináptico excitador en la circunvolución dentada. Ambas condiciones mejoran el aprendizaje y la memoria (Praag et al., 2000), por lo que se ha considerado al ejercicio como una forma de aumentar la cantidad de nuevas neuronas en el GD. Estos resultados sugieren que la mejora en el aprendizaje debido al ejercicio se debe en parte a la inducción de neurogénesis en el hipocampo.

### **3.6. Enriquecimiento ambiental y duración de los efectos**

Hasta el momento se han descrito una gran cantidad de beneficios que tiene el EA sobre la conducta y en los cambios que induce sobre la plasticidad cerebral, pero la literatura refiere pocos trabajos que hablen sobre la durabilidad que pueden llegar a tener estos efectos.

Entre los pocos trabajos que han analizado la persistencia de los efectos del EA sobre la neurogénesis se encuentra el publicado por Kempermann et al. (1997). En ese estudio se encontró que la persistencia del aumento en la neurogénesis después de cuatro semanas de que los roedores fueron expuestos al EA (Kempermann et al., 1997). Además, en un estudio de nuestro grupo se encontró (Vega et al., 2016) que la pre-exposición de los roedores de la cepa Balb/C a un EA por cinco semanas generó resistencia ante los efectos de la exposición a un protocolo de estrés crónico impredecible (ECI) durante cuatro semanas. Entre los cambios a nivel estructural que se mantuvieron por la exposición al EA, aún después del ECI, fueron un mayor número de células positivas a la proteína doblecortina, así como el mantenimiento en la complejidad del árbol dendrítico (Volkmar et al., 1972). De tal modo que este estudio ha sugerido que los efectos del EA pueden persistir hasta un mes después del cese de éste.

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

El EA promueve beneficios conductuales e induce cambios en la plasticidad cerebral. Entre los cambios plásticos se encuentra la generación de neuronas en el GD del hipocampo. Estas neuronas han sido asociadas con un mejoramiento cognitivo y con las conductas asociadas a trastornos afectivos. Además, este paradigma genera modificaciones en la expresión de factores de crecimiento y neurotrofinas a nivel periférico y central. Respecto a la generación de neuronas, el EA impacta los diferentes eventos del proceso tanto en condiciones fisiológicas como en modelos experimentales de algunas enfermedades neuropsiquiátricas.

A la fecha existen pocos trabajos que hayan reportado los efectos a largo plazo del EA sobre el proceso neurogénico y conductual. Entre los trabajos que existen se ha descrito que el incremento en la proliferación celular en ratones hembra de la cepa C57Bl/6 persisten después de tres meses que cesó el alojamiento en EA sin impactar en el proceso de aprendizaje y memoria (Kempermann et al., 1997). Por otra parte, un estudio de nuestro grupo reportó que los efectos del EA sobre la neurogénesis persistieron durante cuatro semanas en los que ratonas hembras de la cepa Balb/C que fueron expuestas a un modelo de ECI (Vega et al., 2016).

A pesar del gran número de estudios relacionados con el EA, a la fecha no se conocen los efectos a largo plazo del EA sobre tres aspectos que son: 1) la neurogénesis, 2) conductas asociadas con la ansiedad y 3) con el proceso de aprendizaje y memoria en ratones macho de la cepa Balb/C. De tal modo que en este trabajo se exploraron los efectos del EA sobre los 3 puntos anteriores en tres diferentes tiempos: 1) inmediatamente después de terminar un mes del EA, 2) al mes y 3) al tercer mes de que el alojamiento en EA terminó.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. Objetivo general**

Investigar la persistencia de los efectos del EA sobre la neurogénesis del GD del hipocampo, así como sobre conductas asociadas con la ansiedad y con el proceso de aprendizaje y memoria

### **5.2. Objetivos específicos:**

1. Estudiar el efecto inmediato, al mes y a los tres meses después de la exposición por un mes del EA sobre la neurogénesis en el GD del hipocampo de ratones de la cepa Balb/c.
2. Estudiar el efecto inmediato, al mes y a los tres meses después de la exposición por un mes del EA sobre el aprendizaje y la memoria de tipo aversivo en ratones de la cepa Balb/c, empleando la tarea de evitación pasiva
3. Estudiar el efecto inmediato, al mes y a los tres meses después de la exposición por un mes del EA sobre las conductas asociadas a ansiedad de ratones de la cepa Balb/c

## **6. Hipótesis**

H1. La neurogénesis en el giro dentado de ratones macho de la cepa Balb/C aumentará de forma inmediata, al mes y a los tres meses posteriores a la exposición por un mes al ambiente enriquecido.

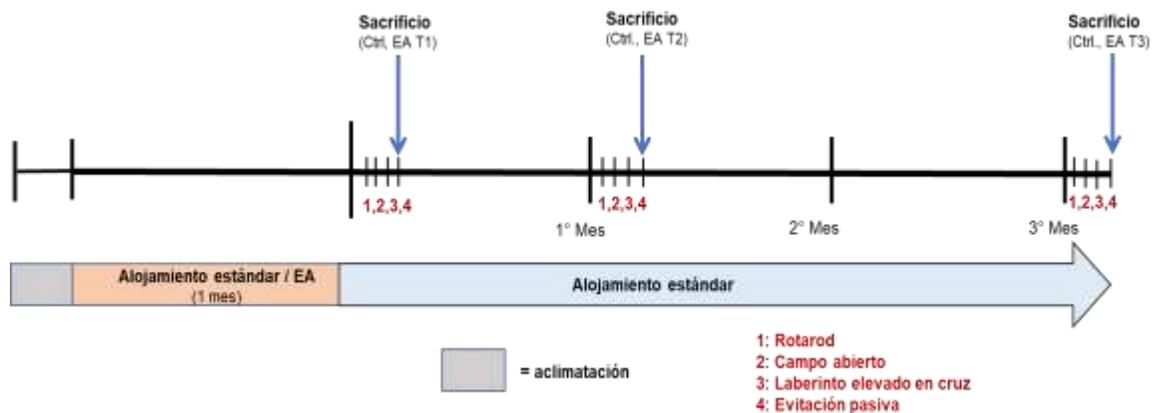
H2. El aprendizaje y memoria de tipo aversivo de ratones macho de la cepa Balb/C aumentará de forma inmediata, al mes y a los tres meses posteriores a la exposición por un mes al ambiente enriquecido.

H3. Las conductas asociadas a ansiedad en ratones macho de la cepa Balb/C disminuirán de forma inmediata, al mes y a los tres meses posteriores a la exposición por un mes al ambiente enriquecido.

## 7. Metodología

### 7.1. Animales

Se utilizaron 42 ratones macho de la cepa Balb/C. Estos ratones se alojaron en condiciones de temperatura controlada y con un ciclo luz-oscuridad (12/12) en el bioterio del Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente Muniz". Los ratones tuvieron acceso libre a comida y agua. Una vez que llegaron a la edad de ocho semanas los ratones fueron asignados a 1) Grupo Control (Ctrl.) y 2) el grupo experimental con exposición a EA. A partir de estos dos grandes grupos de veintiún animales en cada condición, los sujetos de cada grupo fueron distribuidos en tres grupos diferentes con una n de 7 sujetos cada uno de estos grupos. El primer grupo fue sacrificado inmediatamente después de la exposición al EA (tiempo 1, T1), el segundo que se sacrificó al mes del cese del EA (tiempo 2, T2) y el último que fue sacrificado tres meses después de la exposición al EA (tiempo 3, T3). Antes de ser sacrificados todos los animales, fueron expuestos a la batería de pruebas conductuales. La siguiente figura (**Figura 6**) muestra el curso temporal de los procedimientos experimentales.



**Figura 6:** Línea del tiempo de los procedimientos experimentales.

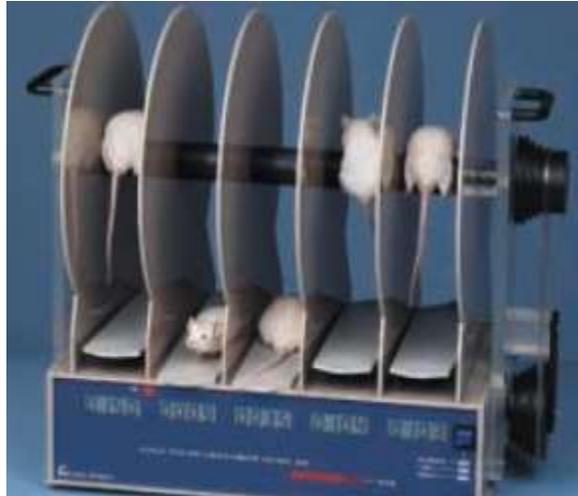
## 7.2. Condiciones de alojamiento

Grupos control: los ratones se alojaron en condiciones estándar en una caja de 43.5x30.5x20 cm., con siete ratones en cada caja y con cama de aserrín durante todo el periodo experimental. Grupos EA: los ratones fueron alojados en una caja de 43.5x30.5x20 cm. y con una cama de aserrín. El ambiente enriquecido se modeló con una rueda fija para ejercicio voluntario, dos bolas de papel y tres túneles de diferente tamaño con textura rugosa. La novedad en el EA se mantuvo al reorganizar el acomodo de los túneles cada tercer día. Una vez que se completo el mes de EA, se procedió a retirar. Posteriormente, se aplicaron las pruebas conductuales en los T establecidos (**Figura 6**).

## 7.3. Pruebas Conductuales

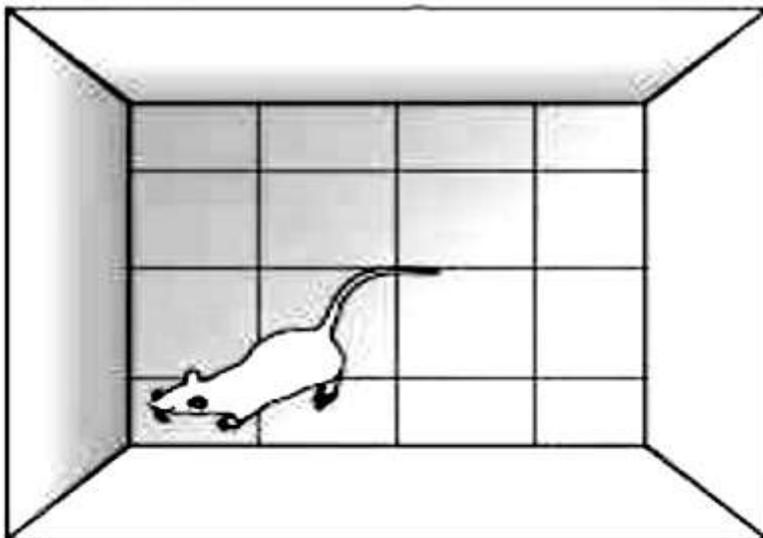
La batería de pruebas conductuales incluyó el Rotarod, exposición al campo abierto, al laberinto elevado en cruz y finalmente a la evitación pasiva.

Rotarod: es una prueba de rendimiento basada en un cilindro giratorio con actividad motora forzada. La prueba mide parámetros como el tiempo de conducción o la resistencia. Los ratones se colocaron en los compartimentos del rotarod *Stoelting* (**Figura 7**). El equipo hace una aceleración continua de las revoluciones por minuto, por lo que mientras más tiempo pasaban en el cilindro, está gira con mayor velocidad hasta que el ratón caiga y es ahí donde se detiene la prueba; se expuso dos veces a la prueba, la primera como una fase de habituación y la segunda como la prueba. El parámetro que se evaluó fue el tiempo de permanencia en el cilindro durante su rotación.



**Figura 7:** Rotarod

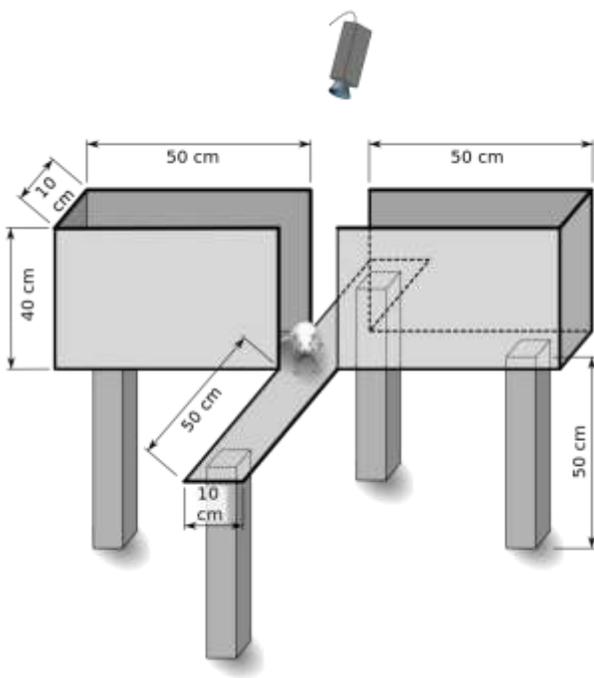
Campo abierto: esta prueba se ocupó con la finalidad de evaluar conductas ansiosas, pues se provoca un comportamiento ansioso al colocar a un sujeto solo en un espacio abierto (agorafobia) y nuevo sin la posibilidad de escapar. Los ratones se colocaron en una caja de 43.5x30.5x20 cm. **(Figura 8)**. El comportamiento de los roedores se grabó con un video cámara (SONY) durante cinco minutos. Los parámetros que se evaluaron fueron el número de cruces por el centro, así como el tiempo que pasaba en la periferia y en el centro; el animal se coloca en una esquina y posteriormente se hace la grabación durante 5 minutos.



**Figura 8:** Campo abierto

Laberinto elevado en cruz: con el fin de evaluar conductas asociadas a rasgos de ansiedad. El laberinto está conformado por dos brazos abiertos uno frente al otro de 50 cm de largo x 10 cm de ancho, son dos brazos laterales conectados por un centro, con otros dos brazos cerrados del mismo tamaño, con paredes lisas y sin techo, elevado a 50 cm del suelo (**Figura 9**). Los ratones fueron colocados en el centro del laberinto con orientación de la cabeza del ratón hacia algún brazo abierto, y se toma un video de 5 minutos. Las conductas que se midieron con esta prueba fueron: frecuencia de entrada en brazos abiertos, así como el tiempo que

permanece ahí y las mismas medidas para los brazos cerrados



**Figura 9:** Laberinto elevado en cruz

Evitación pasiva: esta prueba se realizó empleando un sistema de evitación a través de un equipo GEMINI™ (Stoelting) (**Figura 10**), que operó con un programa de registro de parámetros fijos. Esta prueba se empleó para evaluar el aprendizaje y la memoria aversiva. Las fases que se realizaron fueron:

1) En la primera sesión se expone a los animales de manera individual al aparato, colocándolos en primera instancia en el apartado que tiene exposición constante a la luz, una vez colocado al ratón en la caja, ésta se cierra para dar por iniciada la prueba. La prueba tiene una duración de 200 segundos en los que el animal tenía la opción de desplazarse al apartado que no contiene luz y ser detectado por los sensores táctiles de la caja, en cuyo caso recibió una descarga de 2.0mA durante 200sec. Esta fase acaba una vez pasados los 200 segundos o el choque en las patas.

2) La siguiente fase se realizó media hora después de la sesión anterior, se volvió a colocar al animal en el apartado donde está expuesto a luz, al cerrar la puerta la

sesión inicia, cuando el ratón cruza al apartado sin luz se acaba la prueba (no hay choque). La prueba acaba una vez pasados los 200 segundos o cruzado a la caja sin luz.

3) La última sesión se realizó 24 horas después de la primera, en esta se coloca al ratón en el apartado con luz donde inicia la prueba, y acaba cuando esté cruza al apartado sin luz (sin choque) o una vez pasados los 200 segundos.



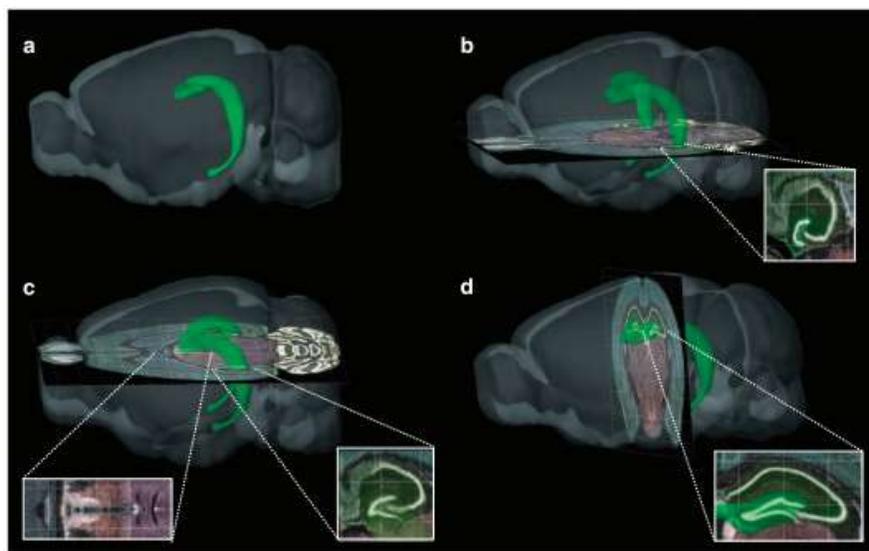
**Figura 10:** Sistema de evitación conductual GEMINI™

*Análisis en el programa AnyMaze:* Las pruebas conductuales que fueron analizadas con el programa Any-maze (Stoelting) son la de campo abierto, para obtener parámetros de interés como el tiempo y entradas en la periferia, así como los cruces y tiempo en el centro para cada uno de los grupos; y el laberinto elevado en cruz, que se programo para reportar el tiempo y entradas, ya sea en los brazos abiertos y a los brazos cerrados. Para los análisis utilizando el Any-maze se abrían los videos en el programa, seguido de un trazado de las áreas, para el campo abierto (las delimitaciones de periferia y centro) y del laberinto elevado en cruz especificando y delimitando cuales son los brazos abiertos y cuales los cerrados. El programa cuenta con criterios estándar para las variables que se le solicitan, en el caso de las entradas a algunas de las áreas de interés en los aparatos, el criterio para el programa es mínimo estén  $\frac{3}{4}$  partes del cuerpo del ratón y con la cabeza orientada hacia esa área, y el parámetro del tiempo de permanencia en algún área empieza

a contar en cuanto el ratón entra, termina cuando sale y se sigue contando el tiempo si vuelve a entrar al área, los datos los reporta en segundos.

#### 7.4. Sacrificio

Al finalizar las pruebas conductuales, los ratones fueron sacrificados por decapitación. Los cerebros fueron colocados en una solución de para-formaldehído al 4% y posteriormente a los siete días éstos fueron transferidos a una solución de sacarosa al 30%. Los cerebros fueron seccionados en un microtomo Leica SM 2010R para realizar cortes coronales para obtener HD y cortes transversales para obtener HV de 40 micras de espesor del mismo cerebro (**Figura 11**). Los cortes fueron colocados en placas de 96 pozos que contenía solución crioprotectora (25% de glicerol y 25% de etilenglicol) y se almacenaron a 4°C.



**Figura 11:** Nuevo método de seccionamiento. (a) El hipocampo de roedor en forma de J (verde). (b) Para obtener secciones para el HV, el cerebro fue congelado en el soporte en el lado dorsal y luego seccionado a 40  $\mu\text{m}$  a lo largo del plano axial desde el lado ventral del cerebro hacia el dorso produciendo secciones de DG ventrales uniformes. (c) Al llegar al comienzo del tercer ventrículo marcando la sección media de la GD el espécimen se separa. (d) reorienta y une por su lado caudal para seccionar el HD a lo largo de la corona plano. Tomado de Egeland et al., 2017.

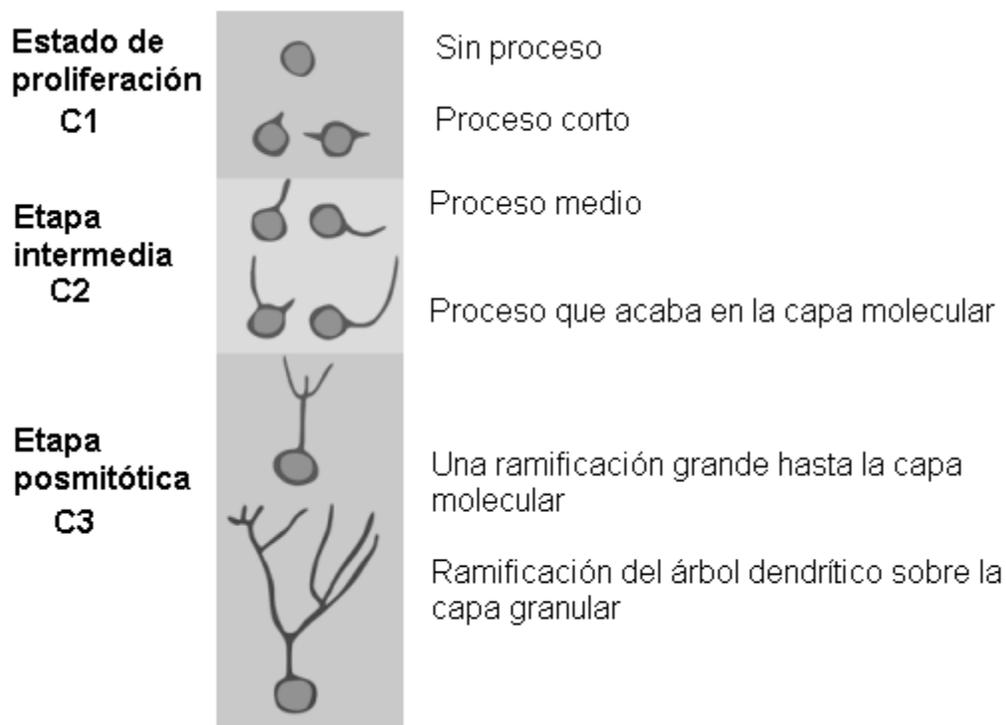
#### 7.5. Inmunohistoquímica

Un marcador clásico de la neurogénesis es la proteína doblecortina. Los cortes cerebrales fueron procesados para identificar esta proteína. A partir de los cortes se tomó una columna de la placa de 96 pozos que dieron como resultado 6-8 cortes con HD y 6-8 cortes con HV. Los cortes fueron tratados con una solución amortiguadora de citratos (SC) a un pH 6.0 durante 30 minutos a 96°C. Posteriormente, se hicieron dos lavados con SC frío durante 10 minutos cada uno, seguido de la incubación en una solución de bloqueo y permeabilización compuesta por suero de cabra al 3% y tritón al 0.01%. Entonces el tejido se incubó con el anticuerpo primario de conejo anti-doblecortina (DCX; 1:1000, Abcam) durante una noche a 4°C. Al día siguiente se hicieron tres lavados con una solución amortiguadora de tris pH 7.4 y se agregó el anticuerpo secundario biotinilado anti-conejo hecho en cabra (1:250). Dos horas después el tejido se incubó con el complejo AB (Vector) y finalmente la reacción antígeno anticuerpo se reveló con diaminobencidina. Los cortes fueron montados con el medio neomount y se dejaron secar para realizar la cuantificación de las células positivas a doblecortina.

#### **7.6. Cuantificación celular y categorías de células positivas a doblecortina.**

Las células positivas para DCX se contaron en toda la extensión rostro-caudal de del GD del hipocampo utilizando un objetivo 40x en un microscopio con cámara DM500 de Leica (Leica, Buffalo Grove, IL, EE. UU.). El número total estimado de células marcadas que se localizaron en el GD se calculó a partir de los números resultantes estimados multiplicados por 12.

Para la cuantificación de las categorías se tomó base en la morfología dendrítica en tres categorías: (C1) células sin y con dendritas más cortas que el tamaño soma, (C2) células con dendritas más grandes que el tamaño soma y (C3) células con una apariencia más madura que muestra una dendrita primaria con al menos un punto de ramificación que alcanza la CM (**Figura 12**).



**Figura 12:** Categorización de la morfología dendrítica. Tomado y modificado de Plümpe et al., 2006.

### 7.7. Análisis estadístico

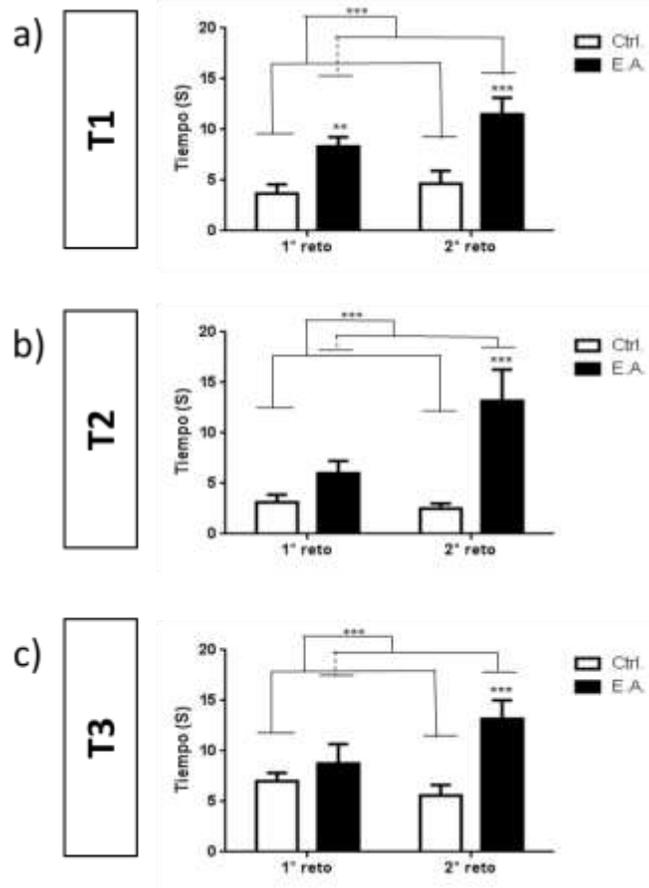
Para la prueba de rotarod se registró la variable de tiempo de permanencia en el cilindro, las dos veces que se retó a la prueba en los grupos EA y controles. En la prueba de campo abierto se registraron las variables de tiempo y entradas en la periferia, así como los cruces y tiempo en el centro para cada uno de los grupos. En el laberinto elevado en cruz se registraron las variables de tiempo y entradas, ya sea en los brazos abiertos y a los brazos cerrados. Finalmente para la prueba de evitación pasiva se reportó la latencia de los roedores para cruzar a la caja sin luz y se reportan las tres sesiones para cada grupo. En las inmunohistoquímicas se muestran el número total de células positivas al marcador DCx reportándose primero el número total (sin diferenciar la región) y después el número de células en cada región (ventral y dorsal) para cada grupo; para las categorías se reportan en porcentaje de células que corresponden a cada categoría de cada grupo, primero se reportaron el porcentaje total y posteriormente el porcentaje por regiones.

Los datos obtenidos se representan usando la media  $\pm$  el error estándar, ocupando como prueba de normalidad Shapiro-Wilk, y como prueba de homogeneidad de varianzas la de Levene, las comparaciones se hicieron con las pruebas *t Student* o *Anova de 2 vías* con su respectiva prueba pos-hoc de Student Newman Keuls. Se ocuparon los programas estadísticos de Sigma Plot versión 10.0 y Graph Path Prism 6.

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Rotarod

Se realizó un Anova de dos vías para comparar el tiempo de permanencia en el cilindro de los animales en las dos veces que se retaron a la prueba, encontrando que para el T1 se observó un incremento en el tiempo de permanencia en el cilindro del Rotarod en los ratones expuestos al EA contra sus controles en las dos veces que se reto al animal a la prueba, siendo que la diferencia significativa principal está dada por la exposición al EA, y no tanto por las veces que se retó (**Figura 13a**) (ANOVA de dos vías, alojamiento  $F_{1,27}=19.28$ ,  $p<0.01$ , reto  $F_{1,27}=53.719$ ,  $p<0.05$ ). De igual manera para el T2 donde se sigue observando un incremento significativo en la permanencia de los ratones en el cilindro por parte de los ratones expuestos al EA comparado con sus controles en ambos retos siendo que la diferencia principal está dada por la exposición al EA (**Figura 13b**) (ANOVA de dos vías, alojamiento  $F_{1,27}=9.28$ ,  $p<0.01$ , reto  $F_{1,27}=43.819$ ,  $p<0.05$ ). Para el T3 se observa un incremento significativo en los ratones expuestos al EA contra sus controles en ambos retos y la diferencia principal está dada por la exposición al EA (**Figura 13**) (ANOVA de dos vías, alojamiento  $F_{1,27}=231.458$ ,  $p<0.01$ , sesión  $F_{1,27}=80.626$ ,  $p<0.05$ )

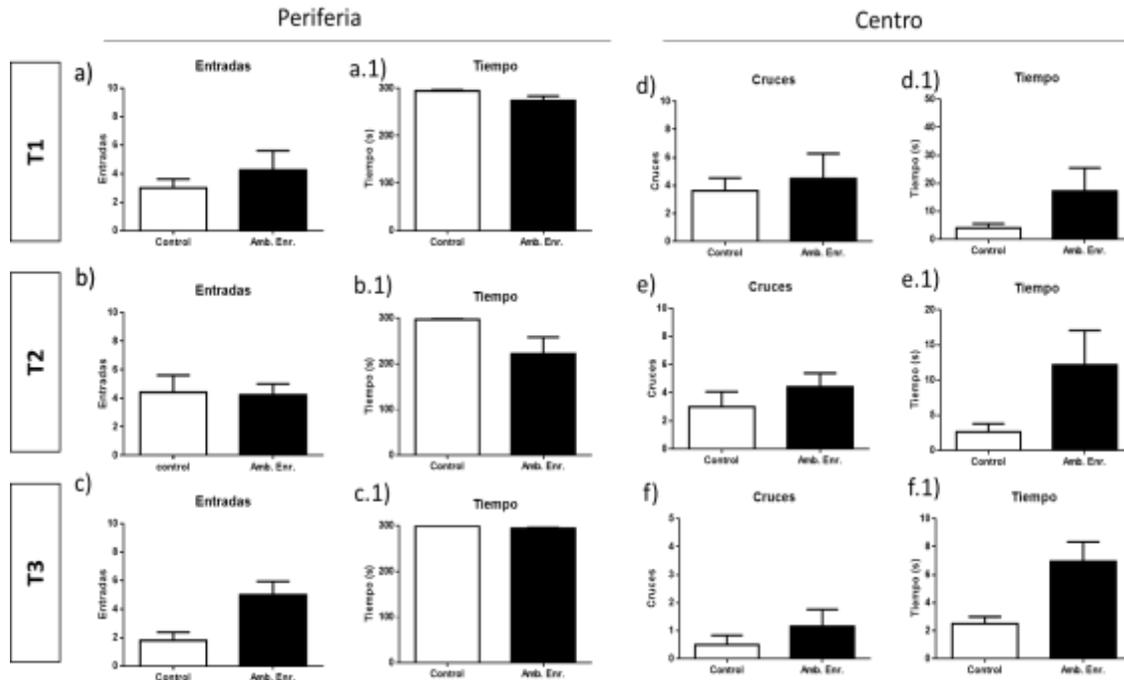


**Fig. 13. Rotarod.** Tiempo en segundos que los animales tardan en caerse del rodillo del Rotarod en ambos retos a los que se les expusieron. En el panel a se presentan los grupos (n=7 para los controles en las barras blancas y n=7 para los EA en las barras negras) del T1; en el panel b se presentan los grupos (n=7 para los controles en las barras blancas y n=7 para los EA en las barras negras) del T2 y en el panel c se presentan los grupos (n=7 para los controles en las barras blancas y n=7 para los EA en las barras negras) del T3. \*\* p<0.01 y \*\*\*p<0.001 ANOVA dos vías seguida de una prueba pos hoc Student Newman Keuls.

## 8.2. Campo abierto

Se aplicó una prueba *t-Student* para comparar la media de cada uno de los grupos con EA contra sus respectivos controles de los tiempos de sacrificio establecidos, en diferentes parámetros, como son los cruces y tiempo que pasa en la periferia, de igual manera para la zona del centro de la caja. Lo que se observó al analizar esta prueba en los ratones de T1 fue que los grupos con EA no hubo diferencias significativas en ninguno de los parámetros tomados en cuenta (**Figura 14a, 14a.1,**

**14d, 14d.1)** pero con tendencia a pasar más tiempo en el centro (**Figura 14d.1**) comparado contra su control (*t-Student*). Al analizar esta prueba en los ratones de T2 es similar a los del T1, en el que los grupos con EA tampoco mostraba diferencias significativas en ninguno de los parámetros tomados en cuenta (**Figura 14b, 14b.1, 14e, 14e.1**), pero se sigue observando la tendencia a pasar más tiempo en el centro (**Figura 14e.1**) comparado contra su control (*t-Student*). En los ratones de T3 se observó que los grupos con EA no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los parámetros tomados en cuenta como se observa en la (**Figura 14c, 14c.1, 14f, 14f.1**) pero con una tendencia que aún permanece de pasar más tiempo en el centro (**Figura 14d.1**) comparado contra su control (*t-Student*)

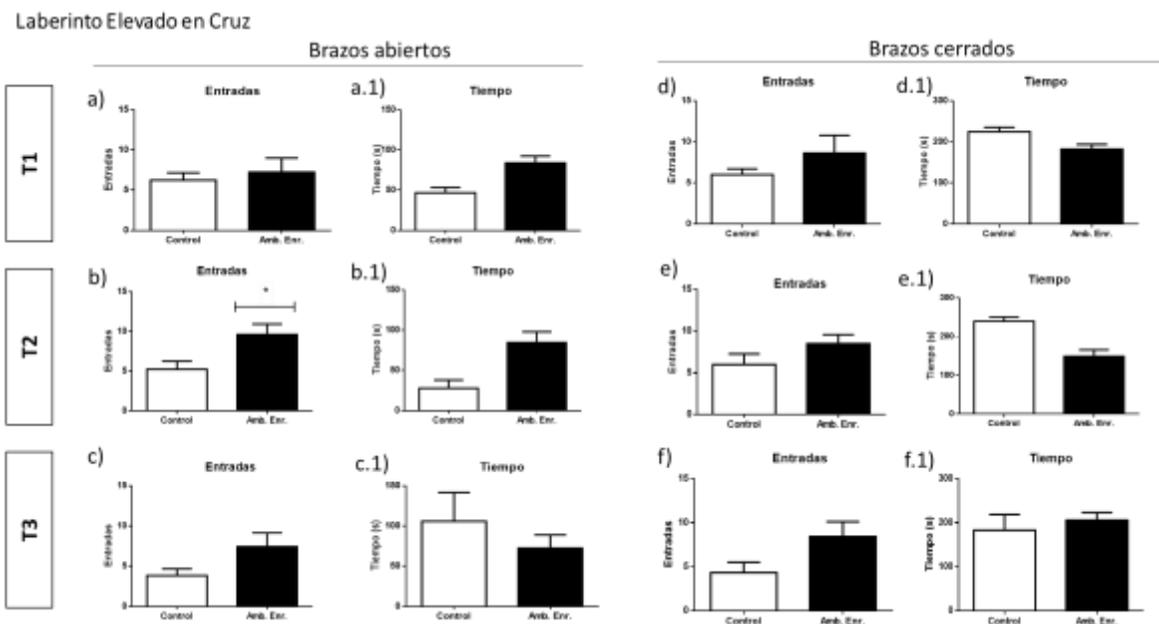


**Figura 14. Campo abierto** Las medidas graficadas, el tiempo y veces que entra a la periferia y el tiempo y cruces que pasa en el centro. En el panel a) se presentan las veces que entra a la periferia mientras que en el panel a.1) el tiempo que permanece en esta zona, el panel d) los cruces que hace en el centro y el panel d.1) el tiempo de permanencia ahí, de los grupos controles y EA (n=7 para los controles en las barras blancas y n=7 para los EA en las barras negras) del T1; el panel b) se presentan las veces que entra a la periferia mientras que en el panel b.1) el tiempo que permanece en esta zona, el panel e) los cruces que hace en el centro y el panel e.1) el tiempo de permanencia ahí, de los grupos controles y EA (n=7 para los controles en las barras blancas y n=7 para los EA en las barras negras) del T2; y por último el panel c) se presentan las veces que entra a la periferia mientras que en el panel c.1) el tiempo que permanece en esta zona, el panel f) los cruces que hace en el centro y el panel f.1) el tiempo de permanencia ahí, de los grupos controles y EA (n=7 para los controles en las barras blancas y n=7 para los EA en las barras negras) del T3. T- Student.

### 8.3. Laberinto elevado en cruz

Para el análisis de esta prueba se aplicó una *t-Student* para comparar a los grupos con EA contra sus respectivos controles en diferentes parámetros, como son las entradas y tiempo que pasa en los brazos cerrados, de igual manera para los brazos abiertos. Lo que se observó al analizar esta prueba del T1 es que los grupos con EA no mostraron diferencias significativas (**Figura 15a, 15a.1, 15d, 15d.1**), pero con

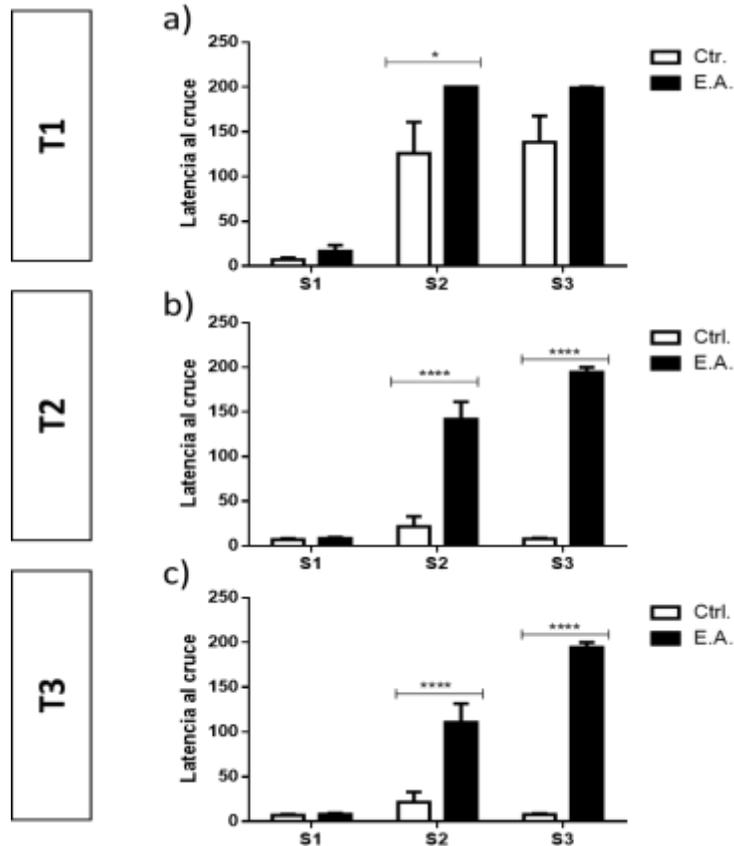
una tendencia a pasar más tiempo en los brazos abiertos comparado contra su control (**Figura 15a.1**) y a pasar menos tiempo en los brazos cerrados comparado con su control (**Figura 15d.1**). De manera similar a T1, en el T2 no se observaron diferencias significativas en el que los grupos con EA, (**Figura 15b**) y presenta las mismas tendencias de pasar más tiempo en brazos abiertos y menos en brazos cerrados comparado contra su control (**Figura 15b.1b y 15d1**). En los ratones de T3 se observó que los grupos con EA no mostro diferencias significativas en ninguno de los parámetros tomados en cuenta (**Figura 15c, 15c.1, 15f, 15f.1**) pero con una tendencia que aún permanece de un mayor número de entradas a los brazos abiertos comparado contra su control (**Figura 15c**).



**Fig. 15. Laberinto elevado en cruz.** Las medidas graficadas, el tiempo y veces que entra a los brazos abiertos y de igual manera para los brazos cerrados. En el panel *a*) se presentan las veces que entra a los brazos abiertos mientras que en el panel *a.1*) el tiempo que permanece en esta zona, el panel *d*) las veces que entra a los brazos cerrados y el panel *d.1*) el tiempo de permanencia ahí, de los grupos controles y EA (n=7 para los controles en las barras blancas y n=7 para los EA en las barras negras) del T1; el panel *b*) se presentan las veces que entra a los brazos abiertos mientras que en el panel *b.1*) su tiempo de permanencia ahí, el panel *e*) las veces que entra a los brazos cerrados y el panel *e.1*) el tiempo que pasa ahí, de los grupos controles y EA (n=7 para los controles en las barras blancas y n=7 para los EA en las barras negras) del T2; y por último el panel *c*) se presentan las veces que entra a los brazos abiertos mientras que en el panel *c.1*) el tiempo que permanece en esta zona, el panel *f*) las veces que entra a los brazos cerrados y el panel *f.1*) el tiempo de permanencia ahí, de los grupos controles y EA (n=7 para los controles en las barras blancas y n=7 para los EA en las barras negras) del T3. \*p<0.05 t-Student.

#### **8.4. Evitación pasiva**

Para el análisis de esta prueba se aplicó una ANOVA de dos vías para comparar a los grupos con EA contra sus respectivos controles en las tres sesiones, las cuales fueron la sesión de adquisición (sesión 1 -S1-), de consolidación (sesión 2 -S2-) y de evocación de memoria a largo plazo (sesión 3 -S3-). Lo que se observó al analizar esta prueba en los ratones de T1 es que los grupos con enriquecimiento mostraron diferencias significativas comparados con su control en la S2 (**Figura 16a**), (ANOVA de dos vías, alojamiento  $F_{1, 41}=9.28$ ,  $p<0.005$ , sesión  $F_{2, 40}=43.819$ ,  $p<0.001$ ). Al analizar esta prueba en los ratones de T2 se encontraron diferencias significativas en los grupos con enriquecimiento contra su control en la S2 y la S3 (**Figura 16b**) (ANOVA de dos vías, alojamiento  $F_{1, 41}=231.458$ ,  $p<0.001$ , sesión  $F_{2, 40}=80.626$ ,  $p<0.001$ , alojamiento x sesión  $F_{2, 40}=70.873$ ,  $p<0.001$ ). En los animales de T3 se observó que los grupos con EA seguían mostrando las mismas diferencias significativas que en el T2 (**Figura 16c**) comparado contra su control (ANOVA de dos vías, alojamiento  $F_{1, 41}=10.09$ ,  $p<0.004$ , sesión  $F_{2, 40}=11.380$ ,  $p<0.001$ ).

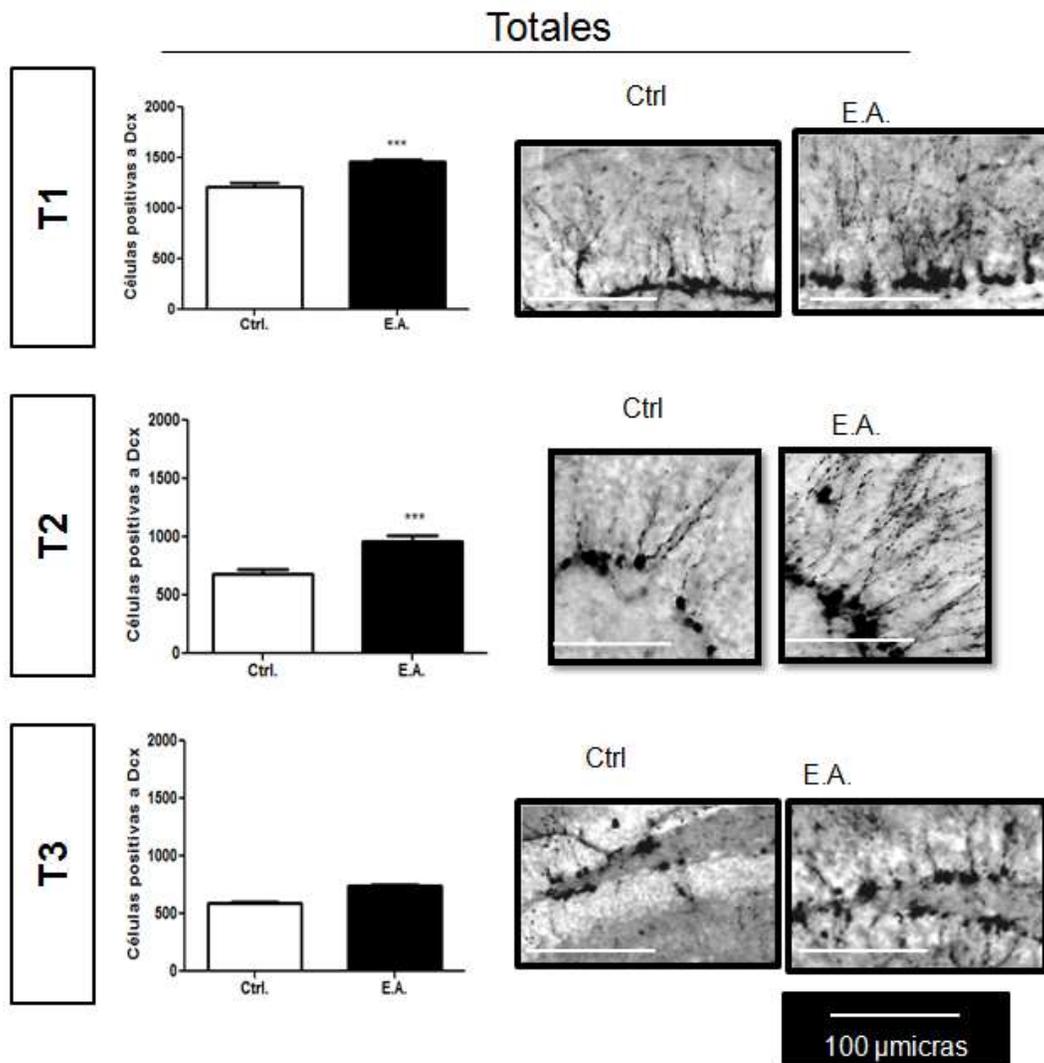


**Fig. 16. Evitación Pasiva.** Latencia en segundos de los animales para cruzar a la caja oscura en las S1, S2 y S3. En el panel *a*) se presentan los grupos ( $n=7$  para los controles en las barras blancas y  $n=7$  para los EA en las barras negras) del T1; en el panel *b*) se presentan los grupos ( $n=7$  para los controles en las barras blancas y  $n=7$  para los EA en las barras negras) del T2; y en el panel *c*) se presentan los grupos ( $n=7$  para los controles en las barras blancas y  $n=7$  para los EA en las barras negras) del T3. \* $p<0.05$  y \*\*\*\* $p<0.0001$  ANOVA de dos vías Student Newman Keuls.

### 8.5. Doblecortina

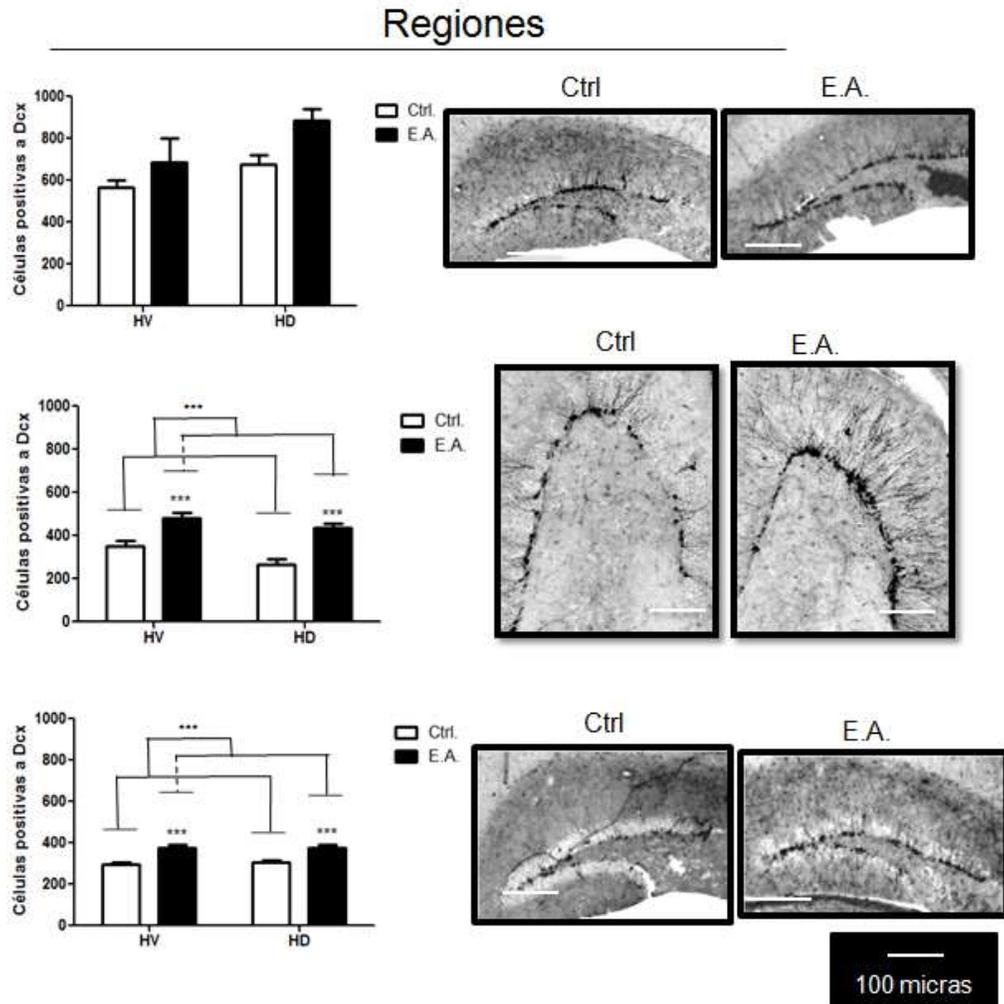
Se contaron en número de células positivas a DCx en el GD del hipocampo, sin hacer diferencias entre el ventral y dorsal. La DCx es un marcador asociado a citoesqueleto que se expresa en diferentes etapas del proceso neurogénico que

abarcen desde la 2a hasta la 2b, por lo que está puede verse como sólo un soma, hasta una neurona con ramificaciones. Lo que se observa para los grupos del T1 es que los ratones con EA presentan un aumento significativo de estas células comparado con su control (**Figura 17a**) (*t-Student*  $p < 0.001$ ). Para los ratones del T2 se observó que los animales del grupo del EA presentan un mayor número de células positivas a este marcador comparado con su grupo control (**Figura 17b**) (*t-Student*,  $p < 0.001$ ). En los grupos de T3 (**Figura 17c**), los animales con EA continúan presentando una tendencia a incrementar comparado con su grupo control, pero no llega a ser significativo (*t-Student*).



**Fig. 17. Células positivas a doblecortia.** Células positivas a este marcador. En el panel *a*) se presentan los grupos (n=5 para los controles en las barras blancas y n=5 para los EA en las barras negras) del T1; en el panel *b*) se presentan los grupos (n=5 para los controles en las barras blancas y n=5 para los EA en las barras negras) del T2; y en el panel *c*) se presentan los grupos (n=3 para los controles en las barras blancas y n=4 para los EA en las barras negras) del T3. \*\*\*p<0.001 t-Student

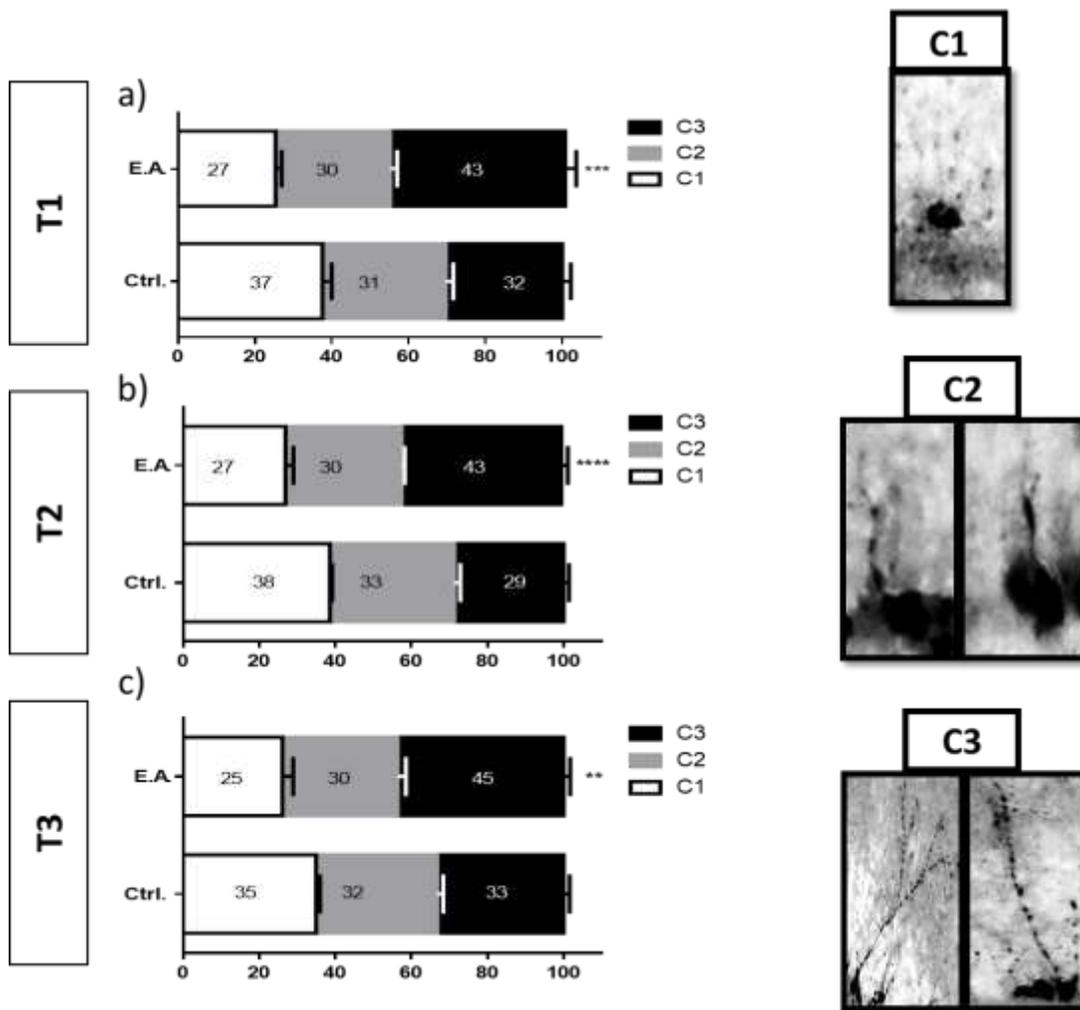
Se cuantificaron las células positivas a DCx en el GD del HV y dorsal para hacer una comparación entre ambas zonas y así asociar su mejora con la conducta analizada, pues cada uno de los hipocampos se caracteriza por modular cierto tipo de conductas. Lo que se observa para los grupos del T1 es que los ratones con EA mostraron una tendencia a tener más células positivas a DCx en la comparación de los hipocampos diferenciados entre ventral y dorsal (**Figura 18a**) sin llegar a ser significativa (ANOVA de dos vías). Para los grupos pertenecientes al T2 se encontraron diferencias significativas de los grupos EA en ambos hipocampos (**Figura 18b**) (ANOVA de dos vías, alojamiento  $F_{1,19}=33.732$ ,  $p<0.001$ ), además de haber una diferencia significativa entre los grupos EA y los Ctrl. (ANOVA de dos vías,  $p<0.001$ ). Se encontró que para el T3 se presentaron diferencias significativas de los grupos EA en ambos hipocampos (**Figura 18c**), además de haber una diferencia significativa entre los grupos EA y los Ctrl. (ANOVA de dos vías, alojamiento  $F_{1,13}=40.711$ ,  $p<0.001$ ).



**Fig. 18. Distribución en las dos regiones (ventral y dorsal).** Células positivas a este marcador. En el panel a) se presentan los grupos (n=5 para los controles en las barras blancas y n=5 para los EA en las barras negras) del T1 en el lado izquierdo al HV y en el lado derecho al HD; en el panel b) se presentan los grupos (n=5 para los controles en las barras blancas y n=5 para los EA en las barras negras) del T2 en el lado izquierdo al HV y en el lado derecho al HD; y en el panel c) se presentan los grupos (n=3 para los controles en las barras blancas y n=4 para los EA en las barras negras) del T3 en el lado izquierdo al HV y en el lado derecho al HD. \*\* p<0.005 \*\*\*p<0.001 ANOVA dos vías seguida de una prueba pos hoc Student Newman Keuls.

## 8.6. Categorías

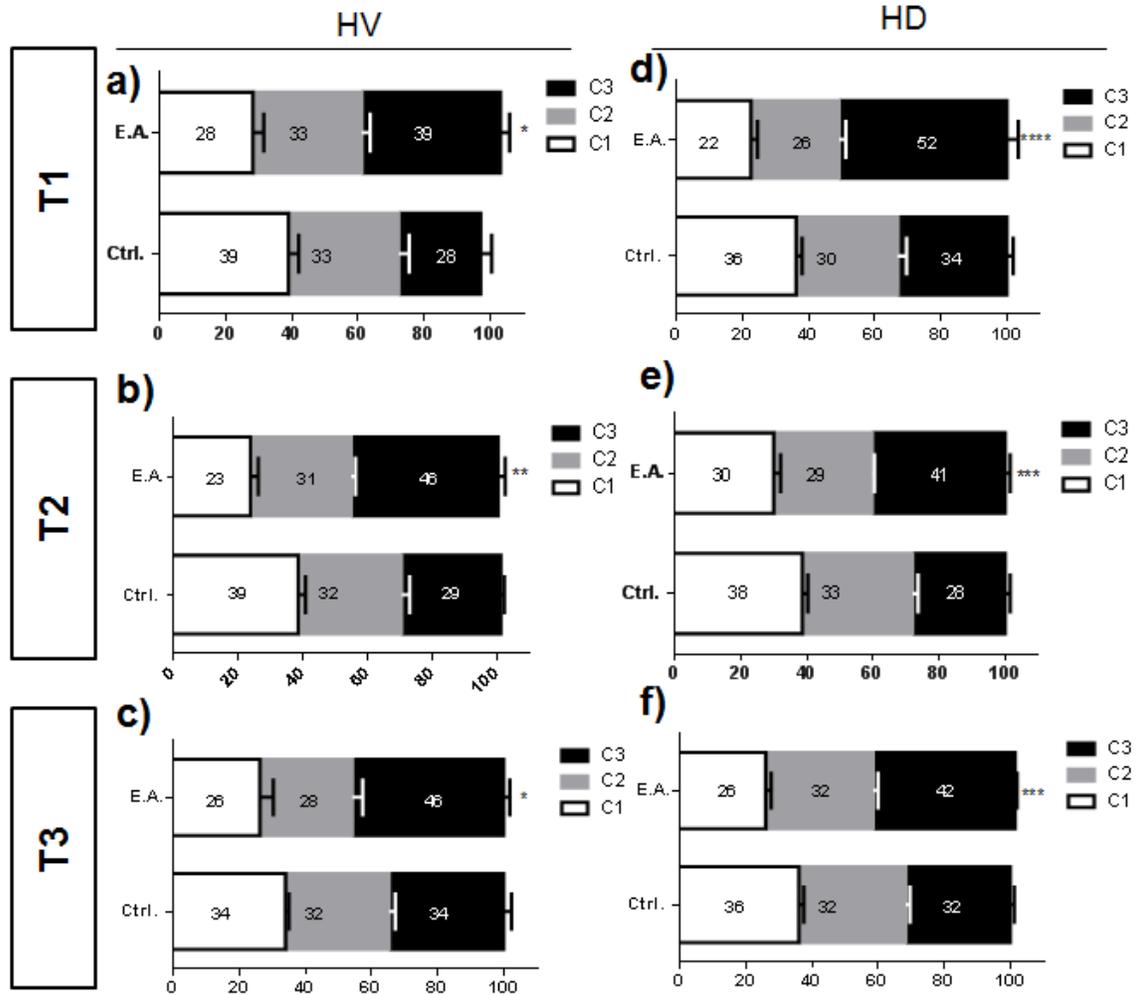
Para categorizar el tipo de células se ocupó la clasificación previamente descrita en la metodología de Plümpe et al. (2006) y los resultados se presenta en porcentajes (fig. 19). Lo que se observa para los grupos del T1 es que los animales con EA presentan un aumento significativo de estas células de C3 comparado con su control **(Figura 19a)** (ANOVA de dos vías, categoría  $F_{1, 29}=3.453$ ,  $p<0.006$ , alojamiento x categoría  $F_{2, 28}=37.251$ ,  $p<0.001$ ). Para los ratones del T2 se observó que los animales del grupo del EA presentan un incremento en las células de C3 comparado con su grupo control **(Figura 19b)** (ANOVA de dos vías, categoría  $F_{2, 28}=83,453$   $p<0.048$ , alojamiento x categoría  $F_{2,28}=37.251$ ,  $p<0.001$ ). En los grupos de T3, los animales con EA continúan presentando un incremento en estas células de C3 comparado con su grupo control (ANOVA de dos vías, categoría  $F_{2, 19}=8.795$   $p<0.003$ , alojamiento x categoría  $F_{2,19}=10.872$ ,  $p<0.001$ ) **(Figura 19c)**.



**Fig. 19. Categorías del marcador doblecortina.** Porcentaje de células positivas a este marcador que se clasificaron en tres grupos dependiendo el largo y morfología de sus dendritas. En el panel a) se presentan los grupos (n=5 para los controles en las barras blancas y n=5 para los EA en las barras negras) del T1; en el panel b) se presentan los grupos (n=5 para los controles en las barras blancas y n=5 para los EA en las barras negras) del T2; y en el panel c) se presentan los grupos (n=3 para los controles en las barras blancas y n=4 para los EA en las barras negras) del T3. \*\* \*\*\*p<0.001 ANOVA dos vías seguida de una prueba *pos hoc* Student Newman Keuls.

La distribución porcentual de las células marcadas con DCx de acuerdo a su diferente clasificación (C1, C2 o C3) para el hipocampo dorsal y ventral se muestra en la figura 20. Lo que se observó para los grupos del T1 es que los animales con EA muestran un aumento significativo de células tipo C3 comparado con su respectivo control, tanto en el HV y HD (**Figura 20a y 20d**) (ANOVA de dos vías HV:

alojamiento x categoría  $F_{2, 28}=22.624$ ,  $p<0.001$ , HD categoría  $F_{2, 28}= 19.221$ ,  $p<0.001$ , alojamiento x categoría  $F_{2, 28}=20.224$ ,  $p<0.001$ ). Para los ratones del T2 se observó que los animales del grupo del EA presentan un incremento en la expresión de este marcador en las células de C3 comparado con su grupo control, en ambos hipocampos, aunque con un mayor porcentaje en el HD (**Figura 20b y 20e**) (ANOVA de dos vías HV: categoría  $F_{2,28}=6.246$ ,  $p< 0.007$ , alojamiento x categoría  $F_{2,28}=23.405$ ,  $p< 0.001$ , HD: alojamiento x categoría  $F_{2,28}=23.734$ ,  $p<0.0001$ ). En los grupos de T3, se observa que los animales con EA continúan presentando un incremento en estas células de C3 comparado con su grupo control, igual que en los T anteriores y de igual manera en el ventral que en el dorsal, siendo más significativo en el dorsal (**Figura 20c y 20f**) (ANOVA de dos vías HV: categoría  $F_{2, 19}=8.845$ ,  $p< 0.003$ , alojamiento x categoría  $F_{2, 19}=6.042$ ,  $p< 0.012$ , HD: categoría  $F_{2, 19}=10.096$ ,  $p<0.002$ , alojamiento x categoría  $F_{2, 19}=26.460$ ,  $p<0.001$ ).



**Fig. 20. Categorías del marcador doblecortina.** Porcentaje de células positivas a este marcador que se clasificaron en tres grupos dependiendo el largo y morfología de sus dendritas, del lado derecho HD y del izquierdo HV. En el panel a) se presentan los grupos (n=5 para los controles en las barras blancas y n=5 para los EA en las barra superior) del T1; en el panel b) se presentan los grupos (n=5 para los controles en las barras inferior y n=5 para los EA en las barras superiores) del T2; y en el panel c) se presentan los grupos (n=3 para los controles para los controles en las barras inferior y n=4 para los EA para los EA en las barras superiores) del T3. \* p<0.05 \*\*\*p<0.001 ANOVA dos vías seguida de una prueba pos hoc Student Newman Keuls.

## 9. Discusión

La persistencia de los efectos neurogénico derivados de una exposición al EA ha sido poco reportada, por lo cual no es claro si existe o si es necesario exponer de manera continúa a los sujetos para poder continuar observando estos efectos. En

este trabajo se abordó el tema con especial atención en el proceso de neurogénesis hipocampal, así como sus implicaciones conductuales en pruebas de ansiedad, memoria y motricidad, en las cuales participa de manera importante el hipocampo.

### **9.1 Conducta**

Se ha descrito que los animales alojados en cajas con EA presentan mejoras significativas en pruebas de motricidad, memoria y otras que evalúan conductas ansiosas (Vega et al., 2016)

La motricidad de los animales puede llegar a ser afectada por el EA ya que en los alojamientos tienen mayor movilidad pues uno entre sus componentes se encuentra una rueda y tubos por los cuales puede estar explorando y exploración a su entorno que es novedoso (Nithianantharajah et al., 2006). Esto se pudo corroborar en los resultados del Rotarod, siendo que los sujetos EA mostraron una mejora significativa en la coordinación motriz pues el tiempo que pasan en el rodillo es mayor al de los grupos controles. En el T1 esta mejora es más evidente, pues en ambos retos el grupo EA es significativamente mayor que su control, sin embargo para el T2 la diferencia principal está dada por los tratamiento y no por diferencias en cada reto, lo mismo se observa para el T3, lo que demuestra que los efectos en la mejora de la motricidad persisten aun cuando su enriquecimiento ha sido retirado, pero que sí disminuye comparados con el grupo del T1.

Entre los beneficios que ofrece el EA son muy mencionados los asociados a conductas ansiosas (Llorens et al., 2011) pues los ratones a los que se les presenta previamente la prueba de nado forzado y se les aloja en cajas con EA, al volverlos a retar al nado pasan menos tiempo inmóviles que su respectivo control por lo cual se dice que el enriquecimiento revierte los efectos adversos derivados de la pre exposición al nado forzado, además de cuantificar marcadores de nuevas neuronas, de proliferación y de nuevas neuronas funcionales (Muotri et al., 2009). En los resultados de las pruebas de campo abierto que fue ocupada para medir conductas ansiosas, se observó tendencias de los grupos EA a tener más cruces en el centro que sus sujetos control, lo cual hace alusión a que están menos estresados, pero

no llegan a ser significativas. Mientras que para la prueba de laberinto elevado en cruz nuevamente se presentan algunas tendencias y una significancia por parte de los grupos EA a pasar más tiempo en los brazos abiertos, lo que nos indica que están menos ansiosos que sus grupos control pues exploran con mayor libertad el laberinto. Estos resultados son similares a los reportados en el trabajo de Vega et al. (2016), en el que se evaluó la preferencia de sacarosa como un indicador de anhedonia después de haber sometido a los ratones a EA por un mes, posteriormente a un protocolo de ECI por otro mes, donde los ratones tienen tendencias a estar menos ansiosos que los controles, lo que indicaba que el EA disminuye los efectos negativos derivados del protocolo de estrés. En este trabajo se observó algo similar sin el estrés, y que estas conductas son capaces de persistir hasta tres meses después de que finalizara la EA. Estos resultados se deben a la dispersión tan grande que hay en cada grupo, lo cual ya había sido sugerido por Kempermann et al. (2018), en el que estudia las diferencias interindividuales derivadas de la exposición al EA en ratones con el mismo fondo genético, pues aunque un grupo se exponga con enriquecimiento los sujetos no interactúan con todos los elementos de manera similar, de ahí que algunos respondan mejor que otros; pese a las diferencias interindividuales se observó una tendencia que sugieren que los animales del grupo EA tienen menos conductas ansiosas que su control en los tres tiempos medidos.

Se ha observado que los protocolos de aprendizaje por medio de diferentes paradigmas al de evitación pasiva como el reconocimiento de objeto novedoso, localización de objeto novedoso, entre otros que hacen acopio de estructuras como el hipocampo y trabajos como los de Tanti et al., (2012), donde observaron, a través de la prueba de reconocimiento de objeto novedoso, que ratones expuestos a EA durante 6 semanas presentaron una mejora en este tipo de memoria, pues exploran más al objeto novedoso. En este trabajo se abordó el paradigma de evitación pasiva para evaluar el acopio de información nueva antes de que haya síntesis de proteínas (corto plazo) (Martínez et al., 2019) y la consolidación de esta, donde se encontraron resultados interesantes, pues en el T1 solo existía diferencia en la sesión dos que evalúa memoria a corto plazo, pareciendo que el EA no tenía un efecto en la

consolidación de recuerdos asociados a un contexto comparado con su grupo control, pero en el T2 las diferencias contra su respectivo control se hicieron evidentes tanto en la sesión 2 como en la sesión 3, por lo que pareciera ser que una sola exposición al EA es suficiente para permitir que esta mejora en la consolidación de nuevos recuerdos se mantenga tanto al mes como a los 3 meses después de que la exposición al EA concluyera, hasta este momento no se había reportado este dato.

La capacidad para evitar estímulos o situaciones amenazantes es una característica clave del miedo adaptativo (Kutlu et al., 2016). El aprendizaje de evitación de estímulos aversivos depende muy importantemente de la amígdala (Martínez et al., 2019; Edelman et al., 2018) siendo esta estructura parte del sistema límbico junto con el hipocampo. Los estudios anatómicos en roedores y primates muestran que la conectividad del HD (o posterior) está implicado en la memoria y la navegación espacial, y que el HV (o anterior) media los comportamientos relacionados con la ansiedad (Strange et al., 2014), de ahí la importancia de diferenciar cual de los dos hipocampos se favorece más por la exposición al EA. Aunque no se encontraron diferencias entre el incremento entre el HV y dorsal de ninguno de los grupos, contrario a lo reportado por Egeland et al. (2017), donde mostraba que en condiciones normales el HD presenta una mayor expresión de la proteína doblecortina, aquí se demostró que la exposición al EA favorece la neurogénesis de todo el hipocampo, que se relacione un mejor rendimiento en la prueba de evitación pasiva con un mayor número de células positivas a doble del HV.

## **9.2 Doblecortina**

Como un indicador de la formación de nuevas neuronas se ocupó este marcador y se hicieron dos tipos de análisis, el primero por la cantidad de células por corte y por región, así como el porcentaje de células que se clasifican dependiendo su maduración. En el primer análisis se observó un incremento de parte de los grupos EA en los dos primeros tiempos en los cuales se midió, lo que ya se tenía demostrado en el trabajo de Vega et al. (2016), aunque si disminuían conforme

pasaba el tiempo hasta llegar a los tres meses después de retirar el enriquecimiento donde este efecto se pierde, pareciendo que no persisten tanto tiempo. Sin embargo, al hacer un análisis diferenciando las regiones de hipocampo se vuelven a encontrar diferencias entre los grupos EA y sus respectivos controles. Mientras que el análisis de porcentaje que utiliza clasificaciones para determinar la maduración neuronal reportada por Plümpe et al. (2006), donde caracterizaron tres principales categorías que hacen alusión al estadio donde se presentan, siendo las C1 células inmaduras pues es sólo el soma, la C2 con una primera prolongación apenas más grande que el tamaño de su soma y la C3 con mayor maduración pues ya muestran las prolongaciones de las dendritas que ya podrían empezar a formar contactos sinápticos; en los resultados los grupos con EA presentaron mayor porcentaje de células de C3, en los totales y en los análisis por región, por lo que se confirma que el número de nuevas neuronas provenientes de la exposición al EA corresponden a un estadio pos mitótico (Vega et al., 2016), y que estas diferencias también se presentan en el análisis por regiones. Llama la atención que esté efecto sí logra persistir cuando ya se retiró el enriquecimiento, aún a los tres meses donde parecía que ya no había diferencia en el número total de células, la maduración de éstas sigue siendo mayor en los grupos con EA.

## **10. Conclusiones**

Hasta este punto había poca evidencia que mostrara la persistencia de los efectos neurogénicos que puede llegar a tener un solo periodo de exposición al EA. En este trabajo se abarcó sus beneficios como un factor protector para responder mejor ante pruebas de ansiedad y memoria, así como una relación entre cambios plásticos en el cerebro y pruebas conductuales.

Los resultados apoyaron las hipótesis de que los cambios benéficos derivados de una exposición de un mes al EA persistirán hasta tres meses después de que esté terminó, en el favorecimiento del proceso de aprendizaje-memoria así como la persistencia del efecto neurogénico, sin embargo no se había considerado la importancia de estudiar la durabilidad que puede llegar a tener, considerando que

no se puede pasar toda la vida de un individuo en un ambiente favorable y enriquecedor, pero que si se tiene durante un determinado tiempo en la edad adulta es suficiente para que pueda generar cambios y que estos puedan persistir.

Se entiende que el campo del EA aún es muy amplio, que aún falta por aclarar muchas preguntas, su estudio es importante y relevante pues la cantidad de efectos benéficos que se puede tener, siendo un blanco de gran importancia para la prevención de trastornos así como coadyuvante con los tratamientos cuando la enfermedad ya se ha establecido; este trabajo aporta información novedosa para el campo del EA pues se demostró que no se necesita exponer permanentemente a los sujetos al ambiente enriquecido para poder seguir observando sus efectos benéficos en la conducta y en la neuroplasticidad, sabiendo que tiene limitaciones al ser un modelo animal, de una cepa con el mismo fondo genético y una exposición al EA de 24 horas, es una aproximación relevante hacia lo que podría pasar en los humanos. Aunque también amplía el panorama para más preguntas que aún falta por contestar, mas procesos de la neuroplasticidad en los que también podría estar impactando el EA, correlaciones interindividuales, etc., sin embargo, este trabajo aporta un dato de relevancia para la perspectiva de las siguientes investigaciones pues demuestra que los efectos neurogénicos persisten aún en ratones adultos.

## 11. Referencias

- Altman J, Das GD. (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124:319-335.
- Amaral, D. G., y Witter, M. P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data. *Neuroscience*, 31(3), 571–591.
- Ambrogini, P., Lattanzi, D., Ciuffoli, S., Agostini, D., Bertini, L., Stocchi, V. Cuppini, R. (2004). Morpho-functional characterization of neuronal cells at different stages of maturation in granule cell layer of adult rat dentate gyrus. *Brain Research*, 1017(1–2), 21–31.
- Baptista, P. y Andrade, J. (2018) Adult hippocampal neurogenesis: Regulation and possible functional and clinical correlates. *Frontiers in Neuroanatomy*. 12(44): 2546-2561..
- Bezard, E. Couillard-Despres, C Enriched environment confers resistance to 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6- tetrahydropyridine and cocaine: involvement of dopamine transporter and trophic factors. *J. Neurosci.* 23, 10999–11007 (2003).
- Birch AM, McGarry NB, Kelly ÁM. Short-term environmental enrichment, in the absence of exercise, improves memory, and increases NGF concentration, early neuronal survival, and synaptogenesis in the dentate gyrus in a time-dependent manner. *Hippocampus* 2013; 23: 437-50
- Bonenfant, D., Fernandes KJL Le Nguyen A, Aumont A, (2014) Untangling the Influences of Voluntary Running, Environmental Complexity, Social Housing and Stress on Adult Hippocampal Neurogenesis. *PLOS ONE* 9(1): e86237. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086237>
- Brandt, M. D., S. Jessberger. (2003). Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Mol Cell Neurosci* 24(3): 603-613.

- Brown, J. P., S. Couillard-Despres, C. M. Cooper-Kuhn, J. Winkler, L. Aigner and H. G. Kuhn (2003) Transient expresión of doublecortin during adult neurogénesis. *J Comp Neurol* 467(1): 1-10
- Carrión, Óscar y Buñuelos, Tatiana y Colín, René. (2007). Neurogénesis en el cerebro adulto. *Revista de Neurología*. 44. 541. 10.33588/rn.4409.2006426
- Carlson, N.R. (2015). Fisiología de la conducta. Barcelona: Ariel Psicología.
- Cimadamore F, Amador-Arjona A, Chen C, Huang CT, Terskikh AV. (2013). SOX2–LIN28/let-7 pathway regulates proliferation and neurogenesis in neural precursors. *Proc Natl Acad Sci USA*; 110: E3017-E26.
- Colcombe, Stanley y Kramer, Arthur. (2003). Fitness Effects on the Cognitive Function of Older Adults A Meta-Analytic Study. *Psychological science*. 14. 125-30. 10.1111/1467-9280.t01-1-01430.
- Comery, T.A., Shah R., Greenough, W. T. (1995). Differential rearing alters spine density on médium-size spiny neurons in the rat corpus striatum: evidence for association of morphological plasticity with early response gene expresión. *Neurobiology of Learning and Memory*, 63,217-219. Doi: 10.1006/nlme. 1995.1025
- Deng, W., J. B. Almoné and F. H. Gage (2010) New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogénesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci* 11(5): 339-350
- Dias, G., Cavegn, N., Nix, A., Stangl, D., Suarhul, M., Egidio, A., Franca, P. y Thiret, S. (2012) The Role of Dietary Polyphenols on Adult Hippocampal Neurogenesis: Molecular Mechanisms and Behavioural Effects on Depression and Anxiety. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 18pp.
- Dominguez, M. I., J. M. Blasco-Ibanez. (2003). Calretinin/PSA-NCAM immunoreactive granule cells after hippocampal damage produced by kainic acid and DEDTC treatment in mouse. *Brain Res* 966(2): 206-217.
- Duan, Lishu y Peng, Chian-Yu y Pan, Liuliu y Kessler, John. (2015). Human Pluripotent Stem Cell-Derived Radial Glia Recapitulate Developmental

Events and Provide Real-Time Access to Cortical Neurons and Astrocytes. *Stem cells translational medicine*. 4. 10.5966/sctm.2014-0137.

- Encinas, J. M., Vaahtokari, A., Enikolopv, G. (2006). Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain. *Proc Natl cad Sci USA*, 103, 8233-8238.
- Edelmann, E., Lessmann, V. Dopaminergic innervation and modulation of hippocampal networks. *Cell Tissue Res* 373, 711–727 (2018)  
doi:10.1007/s00441-018-2800-7
- Egeland, M., Guinaudie, C., Du Preez, A. Depletion of adult neurogenesis using the chemotherapy drug temozolomide in mice induces behavioural and biological changes relevant to depression. *Transl Psychiatry* 7, e1101 (2017) doi:10.1038/tp.2017.68
- Eposito, M. D., Piatti, V. C., Laplagne, D. A., Morgenstem, N. A., Ferrari, C. C., Potossi, F. J., Schinder, A. F. (2006). Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *J Neurosci*, 25, 10074-10086.
- Erickson KI, y col. Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108: 3017-22.
- Eriksson, P. S., E. Perfilieva. (1998). "Neurogenesis in the adult human hippocampus." *Nat Med* 4(11): 1313-1317.
- Espósito MS, Piatti VC, Laplagne DA, Morgenstern NA, Ferrari CC, Pitossi FJ, Schinder AF. (2005). Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *J Neurosci*; 25:10074–86
- Fernandes KJL, Grégoire CA, Bonenfant D, Le Nguyen A, Aumont A, (2014) Untangling the Influences of Voluntary Running, Environmental Complexity, Social Housing and Stress on Adult Hippocampal Neurogenesis. *PLOS ONE* 9(1): e86237.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086237>
- Fortin, K. Agster, H. Eichenbaum, Critical role of the hippocampus in memory forsequences of events, *Nat. Neurosci*. 5 (5) (2002) 458–462
- Fuster J. M. (2009). *The Prefrontal Cortex*. Academic Press, London. Fuster J. M. (2000) Executive frontal functions. *Exp. Brain. Res*. 133, 66-7

- Ge, S., Goh, E., Li Sailor, K.A., Kitabatake, U., Ming, G.L., Song, H. (2006). GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature*, 439, 589-583.
- Gould, E., A. Beylin, P. Tanapat, A. Reeves and T. J. Shors (1999) Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci*2(3): 260-265.
- Gulyas, A. I., R. Miettinen. (1992). Calretinin is present in non-pyramidal cells of the rat hippocampus--I. A new type of neuron specifically associated with the mossy fibre system. *Neuroscience* 48(1): 1-27.
- Hastings, N. B., Gould, E. (1999). Rapid extension of axons in the CA3 region by adult-generated granule cells. *J Comp Neurol*, 413, 146-154.
- Hayakawa, N., Kato, H., y Araki, T. (2007). Age-related changes of astrocytes, oligodendrocytes and microglia in the mouse hippocampal CA1 sector. *Mechanisms of Ageing and Development*, 128(4), 311–316.  
<https://doi.org/10.1016/J.MAD.2007.01.005>
- Hebb, D. O. (1947). The effects of early experience on problema solving at maturity. *Am Psychol*, 2, 306-307. Doi: 10.1037/h0061535
- Hernández, Juan y Juárez Aguilar, Enrique y García-García, Fabio. (2015). El hipocampo: neurogénesis y aprendizaje. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*. 1. 20-28
- Hillman CH, Erickson KI, Kramer AF. Be smart, exercise your heart: exercise effects on brain and cognition. *Nature Rev Neurosci* 2008; 9:58–65
- Holzmann, J. Hennchen, M. and Rohrer, H. (2015), Prox1 identifies proliferating neuroblasts and nascent neurons during neurogenesis in sympathetic ganglia. *Devel Neurobio*, 75: 1352-1367.  
doi:[10.1002/dneu.22289](https://doi.org/10.1002/dneu.22289)
- Jacobowitz, D. M. and L. Winsky (1991). Immunocytochemical localization of calretinin in the forebrain of the rat. *J Comp Neurol* 304(2): 198-218.
- Kaplan M. S. and J. W. Hinds (1977). Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs *Science* 267(5204): 1958-1662

- Kaplan M. S. and J. W. Schuman (1995) Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus. *Science* 267(5204): 1658-1662.
- Keen, N., C. M. Teixeira, A. H. Wang and P. W. Frankland (2007) Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus. *Nat Neurosci* 10(3): 391-399.
- Kempermann G, Körholz, Julia y Zocher, Sara y Grzyb, Anna y Morisse, Benjamin y Pöttsch, Alexandra y Ehret, Fanny y Schmied, Christopher. (2018). Selective increases in inter-individual variability in response to environmental enrichment in female mice. *eLife*. 7. 10.7554/elife.35690.
- Kempermann, G., Jessberger, S., Steiner, B., Kronenberg, G. (2004). Milestones of neural development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci*, 27, 447-252.
- Kempermann G., S. Jessberger, B. Steiner, G. Kronenberg. (2014) Milestones of neuronal development in the adult hippocampus, *Trends Neurosci*. 27 447–452
- Kempermann, G., H. G. Kuhn and F. H. Gage (1997) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386(6624): 493-495
- Kempermann, G. New neurons for 'survival of the fittest'. *Nat Neurosci*. 2012; 13:727-36
- Kjelstrup, K. G., Tuvnes, F. A., Steffenach, H. A., Murison, R., Moser, E. I., and Moser, M. B., (2002). Reduced fear expression after of the ventral hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 99, 10825-10830. Doi: 10.1073/pnas.152112399.
- Kirby ED, Kuwahara AA, Messer RL, Wyss-Coray T. (2015);. Adult hippocampal neural stem and progenitor cells regulate the neurogenic niche by secreting VEGF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 4128-33.
- Knierim, The hippocampus, *Curr. Biol.* 25 (23) (2015) R1116–R1121

- Kim HS. (2014). PSA-NCAM+ Neural Precursor Cells from Human Embryonic Stem Cells Promote Neural Tissue Integrity and Behavioral Performance in a Rat Stroke Model. *Stem Cell Rev*; 10: 761-771.
- Kutlu, M. G., y Gould, T. J. (2016). Effects of drugs of abuse on hippocampal plasticity and hippocampus-dependent learning and memory: contributions to development and maintenance of addiction. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 23(10), 515–533.  
doi:10.1101/lm.042192.116
- L.E.B. Bettio, L. Rajendran, J. Gil-Mohapel. The effects of aging in the hippocampus and cognitive decline. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 79 (2017), pp. 66-86
- Liu HL, Zhao G, Cai K, Zhao HH, Shi LD. (2011). Treadmill exercise prevents decline in spatial learning and memory in APP/PS1 transgenic mice through improvement of hippocampal long-term potentiation. *Behav Brain Res.*;218:308-14.
- Liu, J., K. Solway,. (1998). Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *J Neurosci* 18(19): 7768-7778
- Llorens-Martín, M., Tejada, G. S., Trejo, J. L. (2011). Antidepressant and proneurogenic influence of environmental enrichment in mice: protective effects vs recovery. *Neuropsychopharmacology*, 36, 2460-2468.  
Doi:10.1038/npp.2011.134
- Lobo, Mary Kay y Zaman, Samir y Damez-Werno, Diane y Koo, Ja Wook y Bagot, Rosemary y Dinieri, Jennifer y Nugent, Alexandria y Finkel, Eric y Chaudhury, Dipesh y Chandra, Ramesh y Riberio, Efrain y Rabkin, Jacqui y Mouzon, Ezekiell y Cachope, Roger y Cheer, Joseph y Han, Ming-Hu y Dietz, David y Self, David y Hurd, Yasmin y Nestler, Eric. (2013).  $\Delta$ FosB Induction in Striatal Medium Spiny Neuron Subtypes in Response to Chronic Pharmacological, Emotional, and Optogenetic Stimuli. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 33. 18381-18395. 10.1523/JNEUROSCI.1875-13.2013.

- Martínez-Canabal, A., López-Oropeza, G., Gaona-Gamboa, A., Ballesteros-Zebadua, P., de la Cruz, O. G., Moreno-Jimenez, S., y Sotres-Bayon, F. (2019). Hippocampal neurogenesis regulates recovery of defensive responses by recruiting threat- and extinction-signalling brain networks. *Scientific reports*, 9(1), 2939. doi:10.1038/s41598-019-39136-y
- Morales M., Valenzuela Harrington, M. (2012). Neurogénesis inducida por el ejercicio físico como alternativa terapéutica: desde altman a la actualidad. *Revista Visiones Científicas*. 11. 27-39.
- Moreno-murciano, P, Paz Hernandez, M., Di Caudo, C., Mundinano, I., Vazquez, N., Garcia-Verdugo, J., Sanchez Pernaute, R., Luquin, M. (2013). Sox-2 Positive Neural Progenitors in the Primate Striatum Undergo Dynamic Changes after Dopamine Denervation. *PloS one*. 8. e66377. 10.1371/journal.pone.0066377.
- Myers, D.G. (2005). *Psicología* (7° ed.) Madrid: Editorial Panamericana
- Markakis, E. A., Gage, F. H. (1999). Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles. *J Comp Neurol*, 406, 449-460.
- Martinez-Cue, C. (2002). Differential effects of environmental enrichment on behavior and learning of male and female Ts65Dn mice, a model for Down syndrome. *Behav. Brain Res*. 134, 185–200
- Milner B, Squire LR, Kandel ER. (1998). Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron*, 20, 445-68.
- Ming, G. L., Song, H. (2011). Adult neurogénesis in the mammalian brain: Significant Answers and significant questions. *Neuron Review*, 10, 1016.
- Mishkin M, Suzuki WA, Gadian DG, Vargha-Khadem F. (1997). Hierarchical organization of cognitive memory. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 352:1461-67
- Miettinen, R., A. I. Gulyas. (1992). Calretinin is present in non-pyramidal cells of the rat hippocampus--II. Co-existence with other calcium binding proteins and GABA. *Neuroscience* 48(1): 29-43

- Muotri AR, Zhao C, Marchetto MC, Gage FH. (2009). Environmental influence on L1 retrotransposons in the adult hippocampus. *Hippocampus*; 19:1002–07.
- Nacher, J., J. M. Blasco-Ibanez. (2002). Non-granule PSA-NCAM immunoreactive neurons in the rat hippocampus. *Brain Res* 930(1-2): 1-11
- Nilsson, M., E. Perfilieva. (1999). Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *J Neurobiol* 39(4): 569-578
- Nithianantharajah, J., Pang, T. Y. C., Stam, N. C., Howard, M. L. y Hannan, A. J. (2006). Differential effects of voluntary physical exercise on behavioral and BDNF expression deficits in Huntington's disease transgenic mice. *Neuroscience* 141, 569–584
- Ohlsson, A. L. y Johansson, B. B. (1995). Environment influences functional outcome of cerebral infarction in rats. *Stroke* 26, 644–649
- Overstreet, Wadiche, L., Bromberg, D. A., Bensen, A. L., Westbrook, G. L., (2005). GABAergic signaling to newborn neurons in dentate gyrus *J Neurophysiol*, 94, 4528-4532.
- O'Callaghan RM, Ohle R, Kelly AM. (2007). The effects of forced exercise on hippocampal plasticity in the rat: A comparison of LTP, spatial- and non-spatial learning. *Behav Brain Res*. 176:362-6.
- OMS. (1982). NNeuroplasticidad
- Plümpe, T., Ehninger, D., Steiner, B., Klempin, F., Jessberger, S., Brandt, M., Kempermann, G. (2006). Variability of doublecortin-associated dendrite maturation in adult hippocampal neurogenesis is independent of the regulation of precursor cell proliferation. *BMC Neuroscience*, 7, 77. <http://doi.org/10.1186/1471-2202-7-77>
- Rami, A., A. Brehier. (1987). Cholecalciferin (28-kDa calcium-binding protein) in the rat hippocampus: development in normal animals and in altered thyroid states. An immunocytochemical study. *Dev Biol* 124(1): 228-238.
- Ramírez-Rodríguez, G., Laguna-Chimal, J., Vega-Rivera, N. M., Ortiz-López, L., Méndez-Cuesta, L., Estrada-Camarena, E. M., y Babu, H. (2011).

Los fármacos antidepresivos como reguladores de la neurogénesis hipocámpica de roedores y humanos adultos. *Salud Mental*, 34(6), 497–506.

- Ramon y Cajal S. (1913). Degeneration and regeneration of the nervous system. London: Oxford Univ. Press.
- Rampon, C. H., Jiang, H., Dong. (2000). Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 12880-12884
- Restivo. (2005). Enriched environment promotes behavioral and morphological recovery in a mouse model for the fragile X syndrome. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102, 11557–11562
- Ribal, C. E., Kirn, M. J., Shan, Z., Obenaus, A. (2004). Dendritic growth cones and recurrent basal dendrites are typical features of newly dentate granule cells in the adult hippocampus. *Brain Res*, 1000, 195-199.
- Ribak CE, Seress L, Peterson GM, Seroogy KB, Fallon JH, Schmued LC. (1986). A GABAergic inhibitory component within the hippocampal commissural pathway. *J Neurosci*, 6, 3492-96
- Scoville WB, Milner B. (2000). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. 1957. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 12, 103-13.
- Seress, L., A. I. Gulyas. (1991). Parvalbumin- and calbindin D28k-immunoreactive neurons in the hippocampal formation of the macaque monkey. *J Comp Neurol* 313(1): 162-177.
- Seress, L., A. I. Gulyas, Colado Morente, L. (1992). Pyramidal neurons are immunoreactive for calbindin D28k in the CA1 subfield of the human hippocampus. *Neurosci Lett* 138(2): 257-260.
- Seress, L. and J. Pokorny (1981). Structure of the granular layer of the rat dentate gyrus. A light microscopic and Golgi study. *J Anat* 133(Pt 2): 181-195.
- Seri, B., García-Verdugo J. M., Colado Morente, L., McEwen, B. S., Alvarez-Buylla, A. (2004). Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *J Comp Neurol*, 478, 359-378

- Solomon RL, Corbit JD. (1974) An opponent-process theory of motivation: 1. Temporal dynamics of affect. *Psychol Rev.*;81:119–145.
- Song, Hongjun y Stevens, Charles y Gage, Fred. (2002). Song H, Stevens CF, Gage FH. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 417: 39-44. Soriano E, Frotscher M. (1989). A GABAergic axo-axonic cell in the fascia dentata controls the main excitatory hippocampal pathway. *Brain Res*, 503, 170–74.
- Stam, N. C. Differential effects of environmental enrichment and wheel running in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Soc. Neurosci. Abstr.* (2006).
- Strange, B., Witter, M., Lein, Colado Morente, L . Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nat Rev Neurosci* 15, 655–669 (2014) doi:10.1038/nrn3785
- Tanti, A., Rainer, Q., Minier, F., Surget, A., and Belzung, C. (2012) Differential environmental regulation of neurogenesis along the septo-temporal axis of the hippocampus. *Neuropharmacology* 63, 374-384, doi:10.1016/j.neuropharm.2012.04.022
- Tashiro, A., Makino and F. H. Gage. (2007). Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: a critical period during an immature stage. *J Neurosci* 27 (12): 3252-3259
- Toriyama M. (2012). Phosphorylation of doublecortin by protein kinase A orchestrates microtubule and actin dynamics to promote neuronal progenitor cell migration. *J Biol Chem.*; 287:12691-702. 63.
- Tresguerres, J.A.F. (2010). "Fisiología humana". Interamericana-McGraw-hill. Madrid
- van Dellen, A., Blakemore, C., Deacon, R., York, D. y Hannan, A. J. (2000). Delaying the onset of Huntington's in mice. *Nature* 404, 721–722
- van Praag, H., G. Craske and D. Hermans (2013) Fear extinction and relapse: state of the art. *Annu Rev Clin Psychol* 9: 215-248.

- van Praag, H., Kempermann, G., y Gage, F. H. (2000). Neural consequences of environmental enrichment. *Nature Reviews Neuroscience*, 1, 191. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/35044558>
- van Praag, H., Kempermann, G., y Gage, F. H. (1999). Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus, *Nat Neurosci*, 2,266-270
- Vega-Rivera, N. M., Ortiz-López, L., Gómez-Sánchez, A., Oikawa-Sala, J., Estrada-Camarena, E. M., y Ramírez-Rodríguez, G. B. (2016). The neurogenic effects of an enriched environment and its protection against the behavioral consequences of chronic mild stress persistent after enrichment cessation in six-month-old female Balb/C mice. *Behavioural Brain Research*.
- Volkmar, F. R., Greenough, W. T. (1972). Rearing complexity effects branching of dendrites in the visual cortex of the rat. *Science*, 176, 1445-1447. Doi: 10.1126/science. 176.4042.1445.
- Vukovic J1, Borlikova GG, Ruitenberg MJ, Robinson GJ, Sullivan RK, Walker TL, Bartlett PF. (2013). Immature doublecortin-positive hippocampal neurons are important for learning but not for remembering. *J Neurosci.*; 33: 6603-13.
- Wang, Hang y Tao, Xinrong y Huang, Si-Ting y Wu, Liang y Tang, Hui-Li y Song, Ying y Zhang, Gongliang y Zhang, Yong-Mei. (2016). Chronic Stress Is Associated with Pain Precipitation and Elevation in DeltaFosb Expression. *Frontiers in Pharmacology*. 7. 10.3389/fphar.2016.00138.
- Zhao, Yuan-Yu y Shi, Xiao-Yan y Qiu, Xuan y Zhang, Lei y Lu, Wei y Yang, Shu y Li, Chen y Cheng, Guo-Hua y Yang, Zheng-Wei y Tang, Yong. (2011). Enriched environment increases the total number of CNPase positive cells in the corpus callosum of middle-aged rats. *Acta neurobiologiae experimentalis*. 71. 322-30.